

**ZUR VESIKULIERUNG UND UMSTÜLPUNG VON
ERYTHROZYTE MEMBRANEN MIT HILFE VON
VITAMIN A UND ÄHNLICHER MOLEKÜLE**

Gerhard Leutner

1975

ZUR VESIKULIERUNG UND UMSTÜLPUNG VON
ERYTHROZYTENMEMBRANEN MIT HILFE VON VITAMIN A
UND ÄHNLICHER MOLEKÜLE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Gerhard Leutner
aus
Rosenheim

München 1974



1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Severin
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 1975

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1971 bis September 1974 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München, dem früheren Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München, durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

danke ich herzlich für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und sein Interesse an der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Kurt Hannig

bin ich für die Ermöglichung und großzügige Förderung dieser Arbeit sowie für die guten Arbeitsbedingungen zu großem Dank verpflichtet.

Für die Themenstellung, die anregenden Diskussionen und die stete Unterstützung sowie Anleitung bei vielen der durchgeführten biochemischen Untersuchungen möchte ich

Herrn Dr. Hans-Georg Heidrich

besonders danken.

Mein Dank gilt ferner Frau I. Garms und Herrn Dr. R. Schindler für die Meßmöglichkeit am Zytopherometer sowie Herrn Dr. W. Siegert für die Bereitstellung der Virus influenza-Kulturen.

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	IV
Verzeichnis der verwendeten Symbole	VI
1. Einleitung	1
1.1. Die biologische Membran	1
1.2. Problemstellung	3
1.3. Die Erythrozytenmembran	3
2. Material	5
2.1. Chemikalien und Enzyme	5
2.2. Standard-Puffersysteme	5
3. Biochemische Präparations- und Analysenmethoden	7
3.1. Erythrozyten aus Menschenblut	7
3.2. Darstellung von Erythrozyten-Ghosts	7
3.2.1. Präparation von unsealed ghosts	7
3.2.2. Präparation von resealed ghosts	8
3.2.2.1. Abhängigkeit des resealing von der Temperatur	8
3.3. Vesikulierung der ghosts	8
3.3.1. Rightside-out-Vesikulierung	9
3.3.2. Inside-out-Vesikulierung	11
3.3.2.1. I.O.-Vesikulierung unter unterschiedlichen Bedingungen	13
3.3.2.2. I.O.-Vesikulierung von Neuraminidase-behandelten ghosts	15
3.4. Homogenisation	15
3.5. Elektrophoretische Methoden	16
3.5.1. Trägerfreie Elektrophorese	16
3.5.1.1. Zur Theorie der elektrischen Aufladung von Oberflächen	16
3.5.1.2. Die elektrische Doppelschicht	17
3.5.1.3. Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln in der Elektrophoreseapparatur	19
3.5.2. Beweglichkeitsmessung im Zytopherometer	21
3.5.3. SDS-Gelelektrophorese und Charakterisierung der Membranproteine von ghosts und I.O.-Vesikeln	23
3.6. Mikroskopische Verfahren	25

3.6.1.	Phasenkontrastmikroskopie und Messung der Ghost- und I.O.-Vesikel-Größe	25
3.6.2.	Elektronenmikroskopie	26
3.7.	Dichtegradientenzentrifugation	26
3.8.	Proteinkonzentrationsmessung	27
3.9.	Teste zur Lokalisierung von Enzymen auf der Membranoberfläche	28
3.9.1.	Acetylcholinesterase	28
3.9.2.	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	29
3.9.3.	NADH/H ⁺ -Cytochrom "c"-Oxidoreduktase	30
3.10.	N-Acetyl-neuraminsäure-Gehalt auf der Membranoberfläche	30
3.10.1.	Abspaltung der Neuraminsäure durch Trypsin	30
3.10.2.	Abspaltung der Neuraminsäure durch Neuraminidase	31
3.10.3.	Bestimmung der N-Acetyl-neuraminsäure	31
3.10.3.1	Hydrolyse	31
3.10.3.2	Warren-Test auf N-Acetyl-neuraminsäure	31
3.11.	Bestimmung des Oberflächenladungsanteils von N-Acetyl-neuraminsäure auf der Ghostoberfläche	32
3.12.	SITS-Markierung der Ghostmembran	33
3.12.1.	Fluoreszenzmessung	36
3.13.	Inkubation von I.O.-Vesikeln und ghosts mit Virus influenza	36
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Präparations- und Trennungsmethoden der Membranen	38
4.1.1.	Ausbeute und Lagerfähigkeit von Erythrozyten-ghosts	38
4.1.2.	I.O.-Vesikulierung unter unterschiedlichen Bedingungen	38
4.1.3.	Inkubation der ghosts bei verschiedenen Temperaturen (resealing)	44
4.1.4.	Homogenisationsmethoden	46
4.1.5.	Dichtegradientenzentrifugation	48
4.1.6.	Elektrophoretische Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln	50

4.1.7.	I.O.-vesikulierte ghosts nach vorheriger Neuraminidase-Behandlung	51
4.1.8.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	54
4.2.	Charakterisierung der Membranen	57
4.2.1.	Oberflächen- und Volumenberechnung der ghosts und I.O.-Vesikel	57
4.2.2.	Membrancharakterisierung von ghosts und I.O.-Vesikeln durch die SDS-Gelelektrophorese	58
4.2.3.	Messung der elektrophoretischen Beweglichkeiten der Partikel im Zytopherometer	60
4.2.4.	Neuraminsäuregehalt auf der Innen- und Außenseite der Ghostmembran	60
4.2.5.	Bestimmung des Oberflächenladungsanteils von N-Acetyl-neuraminsäure auf der Ghostoberfläche	63
4.2.6.	Leitenzyme auf der Innen- und Außenseite der Ghostmembran	64
4.2.7.	I.O.-Vesikulierung unter Anwendung von SITS	67
4.2.8.	Inkubation der ghosts und I.O.-Vesikel mit Virus influenza	68
5.	Diskussion	70
5.1.	Zur Charakterisierung der Partikel	70
5.2.	Zum Mechanismus der Vesikulierung	75
6.	Zusammenfassung	81
	Literaturverzeichnis	84
	Lebenslauf	89

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ghost	Nachdem sich das Wort "ghost" in der deutschen Literatur eingeführt hat, wird es in der vorliegenden Arbeit in der englischen Schreibweise verwendet. ghost = leerer Erythrozyt (Blutschatten)
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
EB	Elektrophoretische Beweglichkeit
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz (Titriplex III)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HAC	Essigsäure
HAU	Häm Agglutination Unit
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Puffersubstanz nach Good)
HK	Hexokinase
I.O.	Inside-out
ITP	Inosin-5'-triphosphat
MG	Molekulargewicht
NADH/H ⁺	Reduz. Nicotinamid-adenin-dinucleotid
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PGK	3-Phosphoglycerat-kinase
POPOP	1,4-Bis{2-(4-Methyl-5-phenyl)oxazolyl}benzol
PPO	2,5-Diphenyl-oxazol
resealed	
ghost	Wiedergeschlossene Erythrozytenmembran
R.O.	Rightside-out
SDS	Natriumdodecylsulfat
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-Disulfon- säure, Dinatriumsalz
TCA	Trichloressigsäure
TES	Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthan-sulfon- säure (Puffersubstanz nach Good)
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamid
TRA	Triäthanolamin
TRICIN	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin (Puffersubstanz nach Good)

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
unsealed	
ghost	Durchlässige Erythrozytenmembran
UpM	Umdrehung pro Minute

Verzeichnis der verwendeten Symbole

$\text{\AA}$	Angström
α	Elektrische Leitfähigkeit in μS ($=10^{-6}$ Siemens) bei 20°C
c	Konzentration in Mol/l
e	Elementarladung ($=1,602 \cdot 10^{-19} \text{Cb}$)
E	Extinktion
ϵ	Dielektrizitätskonstante
ϵ_M	Molarer Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$)
η	Viskositätskoeffizient
g	Erdbeschleunigung
H	Elektrische Feldstärke (V/cm)
M	Molar
n	Brechungsindex
O	Teilchenoberfläche
r	Radius des Teilchens
ρ	Spez. Widerstand (Ω/cm)
s	Elektrophoretische Ablenkung in cm
t	Zeit in Sekunden oder Minuten
V	Teilchenvolumen
v	Elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit
ξ	Zetapotential

1. Einleitung =====

1.1 Die biologische Membran

Jede tierische Zelle ist von einer Membran, der Plasmamembran, umgeben. Diese hat physikalische und chemische Funktionen. Ihre physikalischen Funktionen bestehen darin, den Zellinhalt gegen die Umgebung abzugrenzen, die mechanische Festigkeit der Zelle zu gewährleisten, Träger des Oberflächenpotentials zu sein und den Wasserhaushalt der Zelle zu steuern. Die chemischen Funktionen biologischer Membranen sind wesentlich umfangreicher. Die Membran besitzt Rezeptorfunktion für immunologische (Oberflächenantigene), chemische (Hormonrezeptoren, Zellkontakt, Kontaktinhibition), sowie elektrische Steuerungen (Synaptischer Apparat). Biologische Membranen können aber auch rein dynamische Funktionen ausüben, wie die Ausübung von Kontraktionen, von Phagozytose und Pinozytose, sowie den Membranauf- und -abbau. Durch eine Funktion unterscheidet sie sich jedoch von allen künstlichen Membransystemen, nämlich durch den aktiven Transport. Eine biologische Membran kann z.B. Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren. Die dazu benötigte Energie wird durch die jeder aktiven Membran eigenen ATPasen geliefert, welche ATP zu ADP und AMP abbauen. Bei diesen aktiven Transportvorgängen scheinen Carriermoleküle beteiligt zu sein, die mit dem zu transportierenden Molekül einen Komplex eingehen (1). Nachdem dieser Carrierkomplex durch die Membran gewandert ist, wird dieser durch die auf der Membraninnenseite liegenden ATPasen mit ATP gespalten. Das transportierte Molekül ist nun in der Zelle und der Carrier wird in seine ursprüngliche freie Form zurückgebracht.

Zum Verständnis all dieser Funktionen, besonders zu der des aktiven Transportes, müssen Membranmodelle zu Hilfe genommen werden. Sie werden aus den durch Experimente gefundenen Ergebnissen und aus den geforderten Funktionen der Membran entwickelt. Bis heute gibt es allerdings noch kein endgültiges Modell, das all diese Faktoren vereinen kann. Der Grund dafür ist, daß man über die Zusammensetzung und den Aufbau des kom-

plexen Gebildes "biologische Membran" noch zu wenig weiß.

Rein morphologisch scheinen biologische Membranen einfach gebaut zu sein. Im Elektronenmikroskop sieht man eine dreischichtige Struktur mit einer Dicke von 80 bis 100 μm . Dies ist im Prinzip der von Danielli (2) geforderte Aufbau der Membran. Hierbei setzt sich die Membran aus einer äußeren Proteinschicht, einer mittleren Lipid-Doppelschicht und einer inneren Proteinschicht zusammen. Dieses Modell gilt für Plasmamembranen und die Membranen aller Zellorganellen. Die äußere Schicht der Plasmamembran ist jedoch spezialisiert. Sie trägt neben Proteingruppierungen (z.B. Enzyme, adsorbierte Proteine) auch einfache Zucker, höhere Kohlenhydrate (als Antigene funktionierende Saccharide) und zuckerähnliche Moleküle wie z.B. Neuminsäure (Sialinsäure), die entweder an eine Matrix von Protein oder Lipid glykosidisch gebunden ist. Die mittlere Schicht der Membran, die Lipidschicht, besteht vornehmlich aus Phospholipiden und neutralen Lipiden, wie Cholesterol. Diese Lipidmoleküle sind in der Membran so eingebaut, daß ihre hydrophilen Seiten den beiden äußeren Proteinschichten zugewandt sind. Ihre hydrophoben Gruppen bilden den innersten Kern der Membran (hydrophobe Bindungen). Die innere, der Zellmatrix zugewandte Proteinschicht der Membran ist weitgehend unerforscht.

Eine derart aufgebaute Membran wäre ein statisches Gebilde, das unfähig wäre, irgendeine Funktion auszuüben, z.B. die Funktion des Transportes. Durch die hydrophobe Lipidschicht könnten hydrophile Moleküle nicht ohne weiteres die Membran durchdringen. Es wurden daher Membranporen gefordert. Jüngste Experimente (3,4) konnten zeigen, daß Proteinmoleküle die ganze Membran, durch die Lipidschicht hindurch, durchziehen, d.h. von einer Seite der Membran zur anderen. Diese, sowie alle anderen Proteine, sind wahrscheinlich nicht starr fixiert, sondern beweglich in eine flüssige Schicht von Lipidmolekülen eingelagert (5,6,7). Die Membran ist somit kein statisches, sondern ein dynamisches Gebilde.

Die bisherigen Erkenntnisse reichen aber noch nicht zur vollständigen Klärung der Vorgänge in der Membran aus. Die innerste

Proteinschicht, die bei Transportvorgängen durch die Membran eine äußerst wichtige Rolle spielt, wurde dabei auf Grund ihrer Unzugänglichkeit weit weniger in der Literatur beschrieben. Die Erforschung der wichtigen spezifischen Funktionen dieser inneren Proteinschicht und die Kenntnisse der Topographie dieser Schicht, wie auch der äußeren Proteinschicht, ist im Hinblick auf die Gesamtfunktion und zum Verständnis der Membranvorgänge unerlässlich.

1.2. Problemstellung

Um diese innerste, mit dem Zellinhalt in Kontakt stehende Proteinschicht der Membran zu studieren, müssen durch Einstülpungen geschlossene Membranvesikel hergestellt werden, deren Außen-seiten aus der Oberfläche der Zellinnenseite hervorgehen. Die ursprünglich auf der äußeren Oberfläche der Zelle liegenden Gruppen sind in diesen Vesikeln im Inneren verborgen, d.h. einem Test nicht zugänglich. Es ist bekannt, daß einige organische Moleküle, wie Vitamin A, die Erythrozytenmembran endozytose-artig einstülpfen und somit Vesikel bilden, die die Innenseite der Erythrozytenmembran nach außen tragen. Könnte man dieses Verfahren auch auf andere Zellen (oder allgemein auf biologische Membranen) übertragen und eine Methode finden, diese Vesikel von den nicht umgedrehten Membranen abzutrennen, so wäre das ein geeignetes Verfahren, um die Innenseite von Zellmembranen biologischen Experimenten zugänglich zu machen. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Vitamin A sowie ähnlich gebauter Moleküle Vesikulierungen an der Erythrozytenmembran herbeizuführen und zu versuchen, den Mechanismus dieser Einstülpungen zu klären. Fernerhin sollten die gebildeten inside-out-Vesikel von den rightside-out-Partikeln abgetrennt werden, um eine einheitliche Präparation zu bekommen, an der die tatsächliche inside-out-Natur der Membranvesikel untersucht werden konnte.

1.3. Die Erythrozytenmembran

Die in dieser Arbeit ausgeführten Studien wurden an Erythrozytenmembranen ausgeführt, da diese einfach und in großer Menge iso-

liert werden können. Der Erythrozyt ist zwar eine tote Zelle und seine Membran besitzt einige Besonderheiten; sie ist prinzipiell aber genauso aufgebaut wie jede andere biologische Membran. Die Erythrozytenmembran besitzt typische Marker, z.B. an ihrer äußeren Oberfläche einen hohen Gehalt an Neuraminsäure und das Enzym Acetylcholinesterase. Auf der Oberfläche der Innenseite der Membran findet man neben den beiden Enzymen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und NADH/H^+ -Cytochrom-"c" Oxidoreduktase das Dimere Spektrin. Es ist aus zwei Proteinen mit den Molekulargewichten von 255 000 und 220 000 aufgebaut und sitzt locker gebunden auf der Membraninnenseite. Das Spektrin zeigt sich im Elektronenmikroskop als eine unscharfe Zone am Innenrand der Ghostmembran. Demzufolge besitzt die Erythrozytenmembran Marker für ihre Innen- und Außenseite, die es ermöglichen sollten, die aus ihr gebildeten Vesikel zu identifizieren.

2. Material =====

2.1. Chemikalien und Enzyme

Die anorganischen und organischen Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma E. Merck, Darmstadt, bezogen. Promethazin-HCl und Prochlorperazin-Dimaleat wurden mir freundlicherweise von der Firma Dolder Ltd., Basel/Schweiz, Primaquine-Diphosphat von der Firma Bayer Leverkusen, gratis überlassen. Dextran T 110 stammte von der Firma Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala/Schweden und SITS von der Firma Nutritional Corporation, Cleveland, Ohio 44128, USA.

N-Acetylneuraminsäure und die Puffersubstanzen nach Good wurden von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg, bezogen. Neuraminidase (Mucopolysaccharid-N-acetyl-neuraminy-Hydrolase) aus *Vibrio comma* (cholerae) lieferte die Behringwerke AG, Marburg-Lahn und kristallinisches, stabilisiertes "Trypure Novo" (Trypsin) die Novo Industrie GmbH Pharmaceutika, Mainz. Alle übrigen Enzyme und Substrate waren Produkte der Firma Boehringer Mannheim GmbH.

2.2. Standard-Puffersysteme

Sämtliche Puffer wurden unter der Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt.

Isotonischer Erythrozytenpuffer (PBS): 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 8,0 + 0,15 M NaCl. Elektr. Leitfähigkeit: $\alpha = 1,5 \cdot 10^4 \mu\text{S}$.

Hypotonischer Hämolysepuffer: 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 8,0. Elektr. Leitfähigkeit: $\alpha = 7,55 \cdot 10^2 \mu\text{S}$.

Elektrophoreseepuffer: (TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer) 10 mM TRA, 10 mM HAC, 0,1 mM MgSO_4 , mit 2 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Elektrische Leitfähigkeit: $\alpha = 6,7 \cdot 10^2 \mu\text{S}$.

Puffer zur Neuraminsäureabspaltung: 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,4 + 1 mM CaCl_2 .

ACD-Stabilisator: Trinatriumcitrat $\cdot$ $2\text{H}_2\text{O}$, 13,2 g; Citronensäure, 4,4 g; Saccharum amylac. $\cdot$ H_2O , 14,7 g; ad 1000 ml bidest. H_2O .

3. Biochemische Präparations- und Analysemethoden =====

3.1. Erythrozyten aus Menschenblut

Für eine Ghostpräparation wurden jeweils 100 ml Blutkonserven der Blutgruppe O mit positivem Rhesusfaktor (Blutbank Dr. Rasch, München) verwendet.

Zur Gewinnung der gewaschenen Erythrozyten (8) wird das Frischblut (80 ml) + 20 ml ACD-Stabilisator auf acht 50 ml-Polypropylenröhrchen verteilt, mit PBS-Puffer verdünnt und anschließend im Sorvall Rotor SS 34 bei 1 000 UpM (= 121xg) 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Das überstehende Blutplasma wird verworfen, das Erythrozytenpellet wird erneut vorsichtig in PBS-Puffer suspendiert und unter den vorher genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird insgesamt 3 Mal ausgeführt. Die Vereinigung der Niederschläge nach den drei Waschschritten ergibt ein Erythrozytenvolumen zwischen 60 und 70 ml.

3.2. Darstellung von Erythrozyten-Ghosts

3.2.1. Präparation von unsealed_ghosts

Die gewaschenen Erythrozyten (3.1.) werden 20 min. lang in ca. 1200 ml 0,005 M hypotonischen Hämolysepuffer (pH 8,0) unter langsamem Rühren bei 0°-4°C hämolysiert (8). Das Hämolysat wird danach auf 6 Sorvall GSA-Becher aufgeteilt und bei 11 500 UpM (= 21 500xg) 10 min. lang zentrifugiert. Der rote Überstand wird abgesaugt und verworfen. Den rötlichen Ghostniederschlag wirbelt man vorsichtig mit Hämolysepuffer auf und verteilt die Suspension auf 8 eisgekühlte Corex 30 ml-Glasröhrchen, die bei 13 000 UpM (= 20 200xg) 10 min. lang in der Sorvall (Rotor SS 34) bei 4°C zentrifugiert werden. Der Niederschlag wird erneut in Hämolysepuffer aufgenommen, vorsichtig aufgeschüttelt und analog den vorher genannten Zentrifugationsbedingungen so lange gewaschen (insgesamt ca. 5-6 Mal), bis das Ghostpellet weiß geworden ist. Zuletzt werden alle Ghostniederschläge vereinigt und in Corex 30 ml-Gläschen bei 20 200xg 10 min. lang im Sorvall SS 34-Rotor bei 4°C zentrifugiert. In einem graduierten

Zentrifugenglas wird anschließend das Volumen der Ghostsuspension bestimmt (Standardsuspension). Diese enthält ca. 3,2-3,5 mg Protein/ml.

Diese nach der hypotonischen Hämolyse aus Erythrozyten gewonnenen weißen ghosts sind noch nicht geschlossen. Man spricht in diesem Fall von unsealed ghosts, d.h. die Membran ist durchlässig.

3.2.2. Präparation von resealed ghosts

Bei enzymatischen Abspaltreaktionen, spezifischen Tests der Innen- bzw. Außenseite der Membran sowie beim Studium von Transportvorgängen durch die Membran ist es erforderlich, daß eine geschlossene Ghostmembran vorliegt. Das Enzym bzw. Substrat könnten sonst ungehindert die Membran durchdringen und mit der Innenseite reagieren. Um dies zu verhindern, muß die Ghostmembran vorher wieder geschlossen werden. Das Schließen der Membran nach der Hämolyse, das sogenannte resealing erfolgt unter Anwendung von Temperatur (9). Die dabei erhaltenen ghosts werden als resealed ghosts bezeichnet.

Die bei 0°C hämolysierte Ghostsuspension wird bei pH 8,0 und 36°C im Wasserbad eine Stunde inkubiert. Hierbei schließen sich die Zellmembranen wieder und gewinnen ihre ursprünglichen semipermeablen Eigenschaften zurück.

3.2.2.1. Abhängigkeit des resealings von der Temperatur

Um die Abhängigkeit des resealings von der Temperatur zu studieren, wurden die bei 0°C gewonnenen ghosts jeweils bei 32°C, 34°C und 36°C eine Stunde lang im Wasserbad inkubiert. Unter den in Kapitel 3.7. beschriebenen Bedingungen erfolgte nun die Auftrennung der zwei Ghostpopulationen (unsealed und resealed), sowie die Bestimmung ihrer Mengenverhältnisse durch Proteinanalyse (3.8.).

3.3. Vesikulierung der ghosts

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten der Vesikulierung:

- 1) Die Vesikulierung nach außen (Exozytose). Die dabei entstandenen Abschnürungen bezeichnet man nach der Abtrennung als rightsides-out-Vesikel (R.O.).
- 2) Die Vesikulierung nach innen, bei der (gleich einer Endozytose) sich die Membran einstülpt. Die nach der Homogenisation der vesikulierten ghosts freigesetzten Vesikel nennt man insides-out-Vesikel (I.O.). Diese sind jedoch immer mit rightsides-out-Vesikeln verunreinigt.

3.3.1. Rightsides-out-Vesikulierung

Die Abschnürung der ghosts nach außen wurde nach der von J.T. Penniston und D.E. Green (10) beschriebenen Methode ausgeführt. Zu diesem Zweck werden ghosts (1 mg Membranprotein/ml Puffer) mit einer Mischung von 3,4 mg Inosin-5'-triphosphat (6 mM ITP); 0,25 mg Hexokinase und 2,0 mg D(+)-Glucose (10 mM Glucose) pro ml 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung pH 8,0 versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 30 min. beobachtet man zahlreiche Abschnürungen nach außen.

Zur Entfernung der zuvor eingesetzten Reagenzien ITP, Hexokinase und Glucose werden die R.O.-vesikulierten ghosts insgesamt 2 Mal mit TRA-HAC- Mg^{++} -Puffer, pH 7,4, bei 20 000 UpM (= 48 200xg) 10 min. lang bei 4°C in der Sorvall SS 34 gewaschen. Die Abtrennung der an der Membran haftenden R.O.-Vesikel erfolgt durch Homogenisation des in wenig Puffer aufgenommenen Pellets mit der 27-gauge hypodermic Nadel (3.4.).

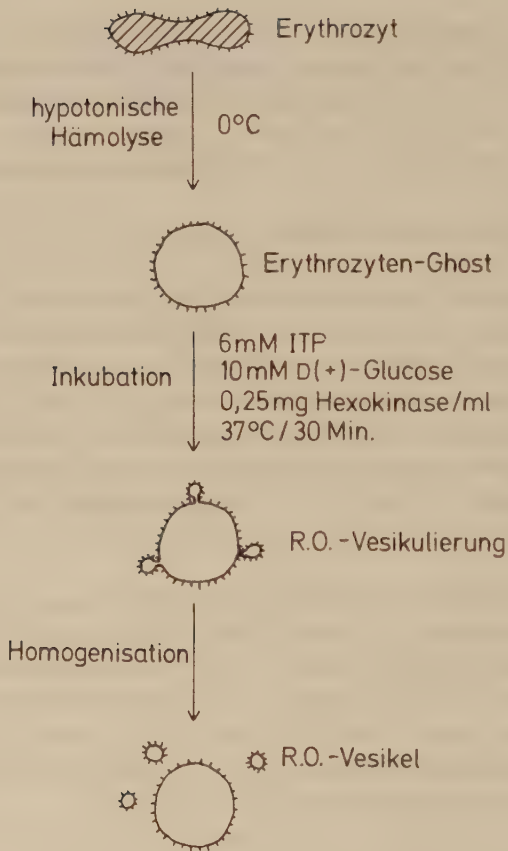


Abb. 1 Schematische Darstellung der rightside-out-Vesikulierung

3.3.2. Inside-out-Vesikulierung

Die Bildung der I.O.-Vesikel aus ghosts erfolgt entweder durch Zugabe von Vitamin A (11,12) oder mittels Primaquine-Diphosphat (13), Promethazin-HCl (14), Prochlorperazin-Dimaleat (14) oder Nonylalkohol (14). Zur Inkubation mit Vitamin A wird eine Stammlösung von 1,0 g Vitamin A - Alkohol (Roche) in 10 ml absolutem Äthanol hergestellt. Die oxydationsempfindliche Lösung muß stets kühl und unter Stickstoff aufbewahrt werden. Die Verdünnung mit Puffer wird unmittelbar vor Gebrauch zubereitet. Die Behandlung der ghosts mit Vitamin A₁ (20 µg/ml) erfolgt bei einer Temperatur von 37°C und liefert nach 60 min. I.O.-vesikulierte ghosts. Da Vitamin A₁ jedoch sehr schwer wasserlöslich ist, wurde daneben auch das leicht wassermischbare Vitamin A - Trockenpulver (1 g = 300 000 i.E.) der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Hierzu wird die ghost-Standardsuspension (3.2.1.) mit 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, im Verhältnis 1:2 verdünnt und pro ml Suspension mit 1 mg Vitamin A - Trockenpulver versetzt. Die Inkubation bei 37°C ist nach 60 min. beendet.

Zur Vesikulierung mit den leicht wasserlöslichen Reagenzien Primaquine-Diphosphat und Promethazin-HCl wurde die Ghostsuspension in 0,005 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 8,0, entweder mit einer 2·10⁻³ M Primaquine-Diphosphat-Lösung oder einer 10⁻³ M Promethazin-HCl-Lösung in 0,005 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 8,0, im Verhältnis 1:1 versetzt und bei 36°C inkubiert. Durch wiederholte Probenentnahme und Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop (3.6.1.) läßt sich der schrittweise Verlauf der inside-out-Vesikulierung verfolgen. Er ist nach ca. 90 min. beendet. Die vesikulierten ghosts werden mit 0,005 M hypotonischem Hämolysepuffer, pH 8,0, versetzt und in der Sorvall SS 34 bei 20 000 UpM (= 48 200xg) 10 min. lang bei 4°C zentrifugiert. Die Abtrennung der I.O.-Vesikel erfolgt durch anschließende Homogenisation.

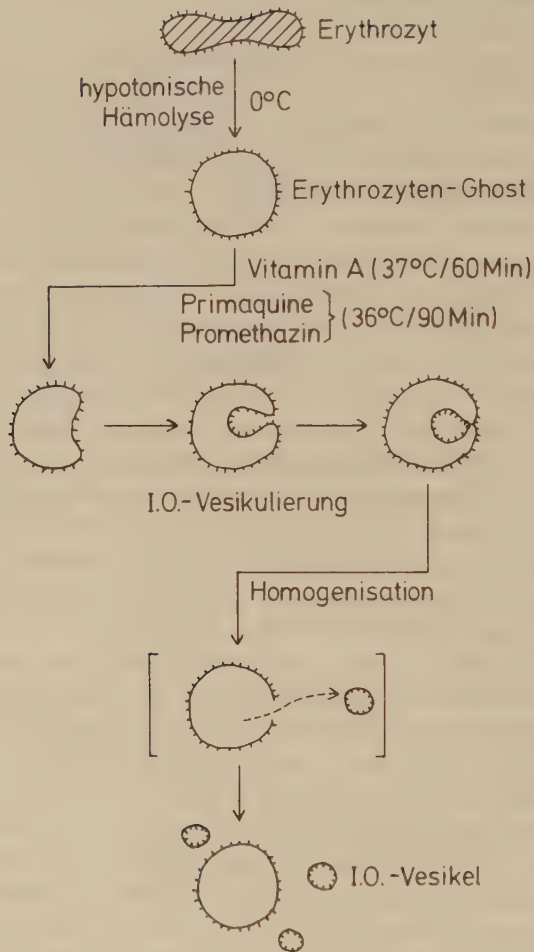


Abb. 2 zeigt schematisch den Aufarbeitungsgang zur Darstellung von inside-out-Vesikeln.

3.3.2.1. I.O.-Vesikulierung unter unterschiedlichen Bedingungen

Bei folgenden Experimenten wurde die I.O.-Vesikulierung unter verschiedenen Inkubationsbedingungen durchgeführt.

1. Zuerst sollte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Primaquine-Diphosphat bzw. Promethazin-HCl und der optimalen Stabilisierung und Vesikulierung der Ghostmembran herausgefunden werden. Hierzu wurden ghosts in 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, im Verhältnis 1:1 mit unterschiedlichen molaren Konzentrationen an Primaquine oder Promethazin (10^{-6} M - 10^{-3} M) bei $36^{\circ}\text{C}/90$ min. behandelt. Die zugesetzte molare Menge an Primaquine und Promethazin wurde anschließend auf die Endkonzentration umgerechnet. Die Auszählung der intakten vesikulierten Ghostzellen erfolgte im Zählquadrat des Phasenkontrastmikroskops. Durch die Bestimmung der ursprünglichen Gesamtzellzahl konnte daraus das prozentuale Verhältnis an ganzen Zellen bei verschiedenen molaren Primaquine- und Promethazinkonzentrationen errechnet werden.
2. Zur Aufklärung eines eventuellen ATP-Einflusses bei der I.O.-Vesikulierung mit Primaquine bzw. Promethazin wurde ^{14}C -markiertes ATP ($3\text{ }\mu\text{Ci}/3\text{ }\mu\text{M}$) herangezogen. Da für die energieabhängige I.O.-Vesikulierung nach Penniston (10) 3 mM ATP erforderlich sind, wurden die als Tracer eingesetzten $3\text{ }\mu\text{M}$ an markiertem ATP durch unmarkiertes Adenosintriphosphat auf 3 mM ergänzt. Das markierte ATP wurde deshalb verwendet, um nachweisen zu können, daß dieses tatsächlich im ghost eingeschlossen ist.

Zunächst wurden die Erythrozyten unter dem Zusatz von 3 mM markiertem ATP und 1 mM MgSO_4 bei 0°C hämolysiert und nach den zur Entfernung des Hämoglobins folgenden 6 Waschschritten mit Primaquine ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) oder Promethazin (10^{-3}M) bei $36^{\circ}\text{C}/90$ min. inkubiert. In einem weiteren Versuch wurden der Ghostsuspension markiertes ATP (3 mM) und MgSO_4 (1 mM) zusammen mit Primaquine bzw. Promethazin zugesetzt und bei $36^{\circ}\text{C}/90$ min. inkubiert. In einem dritten Ex-

periment wurde die gleiche Inkubation durchgeführt, mit dem Unterschied jedoch, daß der hypotonische Hämolyse-puffer Hexokinase (40 mg/100 ml) und 10 mM Glucose enthielt.

Alle Radioaktivitätsmessungen erfolgten nach dem Zusatz von 10 ml Zählflüssigkeit (0,4 % PPO; 0,01 % POPOP in Toluol) im Liquid Scintillation Spectrometer TRI-CARB, Modell 544 der Firma Packard bei der sek. Emissionswellenlänge von $\lambda = 430$ nm. Die Zählzeit betrug entweder 1 min. oder 10 min..

3. Schließlich wurde die I.O.-Vesikulierung in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt. Die molaren Konzentrationen der verwendeten Puffer betrugen hierbei 0,1 M; 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M und 0,001 M. Die jeweiligen Puffer waren: Na-phosphat-Puffer, pH 8,0; Tris-HCl, pH 8,0 (1 N HCl); TES, pH 7,4 (2 N NaOH); TRICIN, pH 7,4 (2 N NaOH) und HEPES, pH 7,4 (2 N NaOH). Von den Puffern, bei denen eine I.O.-Vesikelbildung beobachtet werden konnte, wurden anschließend die Osmolaritäten bestimmt. Diese sind: 0,01 M Tris, pH 8,0 (20 mOsm); 0,01 M TES, pH 7,4 (20 mOsm); 0,01 M HEPES, pH 7,4 (19 mOsm). Eine schwache Vesikulierung zeigten Puffer mit folgenden Osmolaritätswerten: 0,01 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0 (30 mOsm); 0,05 M HEPES, pH 7,4 (75 mOsm) und 0,05 M TRICIN, pH 7,4 (67 mOsm).
4. Weiterhin wurde der Temperatureinfluß auf die Vesikelbildung untersucht. Zu diesem Zweck wurden ghosts mit der Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ M bei Primaquine oder 10^{-3} M bei Promethazin (1:1) versetzt und bei 0°C und 36°C inkubiert. Nach der Homogenisation und dem anschließenden Elektrophoreselauf wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Elektrophoresefraktionen bestimmt.
5. Zum Studium des Vesikulierungsmechanismus wurde nach Zugabe von 6 mM ATP und 0,4 mM Ouabain (= g-Strophanthin) zum Inkubationsmedium (mit und ohne Primaquine) die Vesikulierung im Lichtmikroskop verfolgt.

3.3.2.2. I.O.-Vesikulierung von Neuraminidase-behandelten ghosts

Die aus Human-Erythrozyten gewonnenen ghosts (3.2.1.) in 0,005 M Na-phosphat-Puffer (ca. 40,0 ml) wurden in zwei gleiche Volumenteile geteilt. Der eine Teil wurde nach Zugabe von 10^{-3} M Promethazin-HCl-Lösung in 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, bei $36^{\circ}\text{C}/90$ min. lang inkubiert (3.3.2.). Die ghosts mit den eingeschlossenen I.C.-Vesikeln wurden anschließend 3 Mal homogenisiert (3.4.), mit TRA-HAC- Mg^{++} -Puffer umgepuffert und auf die trägerfreie Elektrophorese gegeben. Man beobachtet eine Aufspaltung in zwei Banden mit den Maxima bei Fraktion 20 und 27. Der andere Teil der Ghostsuspension wurde im Unterschied zum ersten Teil zunächst mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* behandelt (3.10.2.) und dann unter den analogen Bedingungen mit Promethazin-HCl vesikuliert. Nach der Homogenisation und Zentrifugation der Partikel (3.4.) und dem darauffolgenden Lauf in der Elektrophorese zeigen sich ebenfalls zwei Banden (Fraktion 26 und 36). Eine Bande mit dem Maximum bei Fraktion 36 beobachtet man auch, wenn man unversikulierte Neuraminidase-behandelte ghosts unter denselben Trennbedingungen in der trägerfreien Elektrophorese laufen läßt.

3.4. Homogenisation

Die gebildeten I.O.-Vesikel sind nach der Inkubation in den ghosts eingeschlossen und die R.O.-Vesikel hängen noch fest an der Außenseite der Ghostmembran fest. Die weitere Behandlung setzt jedoch voraus, daß die Vesikel frei, d.h. ungebunden vorliegen. Dies wird durch den folgenden Homogenisationsschritt erreicht.

Zur Entfernung der bei der Inkubation zugesetzten Stoffe (Vitamin A, Primaquine, Promethazin bzw. ITP/HK/Glucose) werden die I.O.- und R.O.-vesikulierten Ghosts zunächst mit 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 8,0, 1 Mal in der Sorvall SS 34 bei 20 000 UpM (= 48 200xg) / 10 min. gewaschen. Das Pellet wird dann in etwas 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, aufgenommen (ca. 3 ml Puffer/1 ml Pellet) und anschließend langsam durch eine 27-gauge hypodermic Nadel (8) in 5 ml TRA-HAC-

Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, gepreßt. Die Suspension wird danach noch 2 Mal mit der dünnen Kanüle homogenisiert, mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, aufgefüllt und im Sorvall-Rotor SS 34 bei 20 000 UpM (= 48 200xg) 10 min. lang bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird mit ca. 1-4 ml desselben Puffers versetzt und mit der Pasteurpipette homogenisiert.

3.5. Elektrophoretische Methoden

3.5.1. Trägerfreie Elektrophorese Qualitative Betrachtungen

3.5.1.1. Zur Theorie der elektrischen Aufladung von Oberflächen

Unter der Elektrophorese versteht man generell die Wanderung von gelöstem oder suspendiertem Material unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes. Als elektrokinetisches Phänomen beinhaltet sie die relative Bewegung zwischen einer stationären und beweglichen Phase in der elektrischen Doppelschicht.

Viele Substanzen erhalten in polarer Lösung, z.B. im wässrigen Medium, eine Aufladung der Oberfläche. Die möglichen Mechanismen, die zur elektrischen Aufladung führen können, sind die Ionisation, die Ionenadsorption und die Ionenauflösung.

Für die Oberflächenaufladung von großen Proteinmolekülen, Zellen und biologischen Membranen ist die Ionisation der dissoziierbaren Gruppen sowie die Ionenadsorption an die Partikel von besonderer Bedeutung. Die entgegengesetzt geladenen Pufferionen werden dabei proportional der Teilchenladung an der Oberfläche gebunden. Die Partikeloberflächen neigen jedoch im wässrigen Medium stärker dazu, sich negativ aufzuladen. Der Grund hierfür ist, daß die kleineren, weniger stark hydratisierten und stärker polarisierten Anionen der Pufferlösung, im Gegensatz zu den Kationen, eine größere Bereitschaft zeigen, sich im wässrigen Milieu an das geladene Partikel anzulagern. Die meist größeren, stärker hydratisierten Kationen halten sich dagegen bevorzugt in der Lösung auf. Große Partikel zeigen

demnach eine ausgeprägte Tendenz, sich im pH-Bereich zwischen 5 und 9 negativ aufzuladen und zur Anode hin zu wandern. Die Ladung der Partikel ist darüber hinaus von der Art des verwendeten Puffers, der Pufferkonzentration und dem pH-Wert der Lösung abhängig.

3.5.1.2. Die elektrische Doppelschicht

Partikel, die sich in einem elektrolythaltigen Medium in Suspension befinden, werden von einer elektrischen Doppelschicht umgeben. Diese setzt sich aus zwei voneinander abgetrennten Ionenbereichen zusammen. Der inneren Schicht, der sogenannten Stern- oder Helmholtz-Schicht, mit den fest adsorbierten Pufferionen mit einer Dicke von ungefähr $5 \text{ \AA}$. Sie besitzt eine hohe Ladungsdichte und ist durch die Scherschicht (Scherfläche) von der äußeren Gouy-Capman-Schicht oder Debye-Hückelschen Ionenwolke getrennt. Diese äußere Schicht baut sich im Gegensatz zur Stern-Schicht aus einer diffusen Ionenwolke auf. Mit zunehmender Entfernung von der geladenen Zelloberfläche nimmt die Konzentration der Gegenionen exponentiell ab, d.h. das Oberflächenpotential ψ_0 des Partikels fällt bis zur äußeren Scherschicht auf das Potential ψ_δ ab und verringert sich bis zum äußeren Rand der Scherschicht auf das ξ -(zeta)Potential. In der anschließenden Gouy-Capman-Schicht kommt es zu einer weiteren kontinuierlichen Potentialerniedrigung, die sich am äußeren Rand der Doppelschicht dem Wert 0 nähert. Die geladenen Partikel bilden zusammen mit den Gegenionen in der Doppelschicht eine elektrokinetische Einheit, die je nach der Ladungsdichte verschieden stark im elektrischen Feld abgelenkt wird.

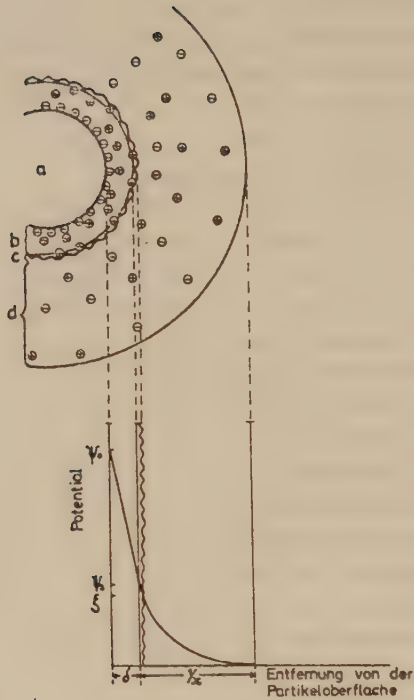


Abb. 3 Schematische Darstellung eines geladenen Partikels mit der ihn umgebenden elektrischen Doppelschicht, sowie Potentialverteilung in den einzelnen Schichten.

- a = Partikel
- b = Sternschicht
- c = Scherschicht
- d = Gouy-Capman-Schicht

Qualitative Betrachtungen

Die Geschwindigkeit, mit der sich ein Partikel bzw. eine Zelle im elektrischen Feld in Gegenwart von Elektrolytionen bewegt, ist ein Maß für seine Oberflächenladung.

Die eigentliche Oberflächenladungsdichte des Partikels ist auf Grund der fest anhaftenden Stern-Schicht nicht direkt meßbar, d.h. die elektrokinetischen Messungen können nur vom beweglichen Teil der elektrischen Doppelschicht (Ionenwolke) abgeleitet werden. Die elektrophoretische Beweglichkeit v ist daher ausschließlich durch die Ladungsdichte an der Scherschicht und das dort herrschende ξ -Potential bestimmt.

Smoluchowski stellt in seiner Gleichung:

$$v = \frac{\epsilon \cdot \xi \cdot H}{4\pi\eta}$$

eine einfache Beziehung zwischen dem ξ -Potential und der elektrophoretischen Beweglichkeit v her.

ϵ = Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 80$)

ξ = Zeta-Potential

η = Viskositätskoeffizient

v = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit

H = elektr. Feldstärke (V/cm)

Die Smoluchowski-Gleichung gilt im Gegensatz zur Gleichung nach Debye-Hückel für Teilchen, die in Bezug auf die Ausdehnung der Ionenwolke relativ groß sind (kein Relaxationseffekt!) und für Puffer mit höherer Ionenstärke ($>10^{-4}\text{M}$). Unter diesen Voraussetzungen ist die Ablenkung im elektrischen Feld nur von der Ladung des Teilchens und nicht von der Partikelgröße abhängig. Die genannten Bedingungen treffen sowohl für die ghosts, die I.O.- und R.O.-Vesikel als auch für den verwendeten Elektrophoresepuffer zu, so daß die Berechnung ihrer elektrophoretischen Beweglichkeiten nach der Gleichung von Smoluchowski erfolgen muß.

3.5.1.3. Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln in der Elektrophoreseapparatur

Zur Durchführung der Versuche wurde die trägerfreie, kontinuierliche Ablenkungselektrophorese, Elphor VAP 5, nach Hannig verwendet (15).

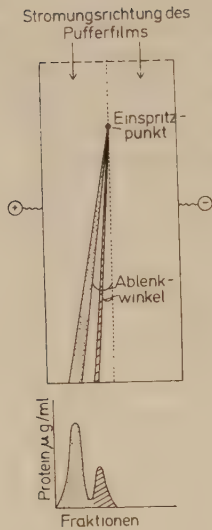


Abb. 4 Schema einer elektrophoretischen Trennung

Die Abbildung 4 zeigt schematisch die Trennung eines Substanzgemisches, das untere Diagramm gibt die Proteinkonzentration der getrennten Banden wieder. Dieses Trennungsbild zeigt sich, wenn ein Gemisch aus R.O.-Partikeln (ghosts) und I.O.-Vesikeln in die Kammer eingespritzt wird. Die punktierte Fläche stellt hierbei die R.O.-Vesikel- oder ghost-Bande (A), die gestrichelte Fläche die I.O.-Vesikel-Bande (B) dar.

Die Trennkammer weist folgende Maße auf: 493 mm Länge, 100 mm Breite, Kammerspaltdicke von 0,4 mm.

Der Kammerpuffer besteht aus: 10 mM TRA/10 mM HAC/ 0,1 mM MgSO_4^- -Puffer, pH 7,4 (2N NaOH), der Elektrodenpuffer aus: 100 mM TRA/100 mM HAC-Puffer, pH 7,4 (2N NaOH). Zur Trennung wurden 120 mA angelegt, die Spannung betrug bei einer Kühltemperatur von $5,5^\circ\text{C}$, 120 V/cm. Die 92-fache Absaugpumpe förderte 2,2 ml pro Fraktion/Std.; die eingespritzte Substanzmenge betrug 2,85 ml pro Stunde.

3.5.2. Beweglichkeitsmessung im Zytopherometer

Die genaue Ermittlung der elektrophoretischen Beweglichkeit (EB) von ghosts, I.O.- und R.O.-Vesikeln sowie der Neura-minidase behandelten ghosts erfolgte mit der analytischen Elektrophorese, dem sogenannten Zeiss-Zytopherometer (16-19). Die Teilchen bewegen sich hierbei in einer zylindrischen Mikroelektrophoresekammer durch das angelegte elektrische Feld je nach Ladung verschieden schnell. Die Kammer hat eine Länge von 120-150 mm und einen Innendurchmesser von 2,0-3,0 mm. Die Wandergeschwindigkeit der Partikel wird an einem vorher geeichten Netzmikrometer mittels eines starr mit der Meßkammer verbundenen Phasenkontrastobjektivs abgelesen. Das bei allen Messungen verwendete Gerät war spannungsstabilisiert.

Die Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Elektrophoreseapparatur. Die Messungen im Zeiss-Zytopherometer wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

25°C; 1293,0 Ω/cm für den TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4; 0,8 mA und 1 V/cm. Die mittleren elektrophoretischen Beweglichkeiten $\pm$ Standardabweichungen wurden dabei jeweils aus hundert ausgemessenen Zellbeweglichkeiten eines Zelltyps berechnet.

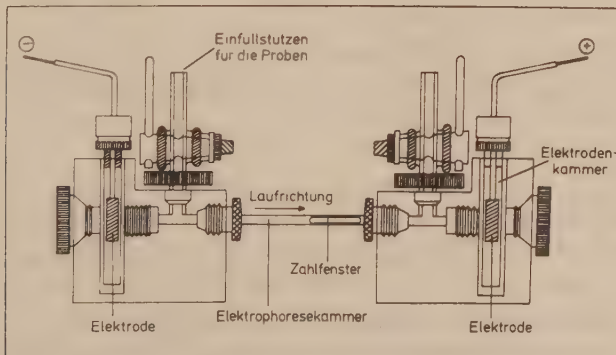


Abb. 5 Schematischer Aufbau der analytischen Elektrophoreseapparatur (Zeiss-Zytopherometer)

Die Berechnung der elektrophoretischen Wandergeschwindigkeit (EB) von Teilchen erfolgt nach der Formel:

$$EB = \frac{\frac{s}{t}}{H} \quad (\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}) \quad (1)$$

Hierbei bedeutet

s = die Strecke (cm), die das Teilchen während der Messung zurückgelegt hat,

t = die Zeit (sec), die das Teilchen für die Zurücklegung von s gebraucht hat und

H = die elektr. Feldstärke (V/cm); sie wird nach folgender Formel errechnet:

$$H = \frac{U}{L} \quad (\text{V/cm}) \quad (2)$$

oder

$$H = \frac{I \cdot R}{L} = \frac{I \cdot \rho \cdot L}{L \cdot q} = \frac{I \cdot \rho}{q} \quad (3)$$

Hierbei bedeutet:

I = die Stromstärke (A)

ρ = der spez. Widerstand des Puffers (Ω/cm)

q = der Querschnitt der zylindrischen Elektrophoresekammer

L = die Länge der Kammer (cm)

U = die Spannung (V)

Die Gleichung (3) gilt für stromstabilisierte Geräte. Da bei allen Versuchen ein Gerät mit konstant gehaltender Spannung U benutzt wurde, muß Gleichung (2) zur Berechnung herangezogen werden. Setzt man Gleichung (2) in Gleichung (1), so erhält man als elektrophoretische Beweglichkeit des Teilchens im spannungskonstanten Feld:

$$EB = \frac{s \cdot L}{t \cdot U} \quad (\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{sec}) \quad (4)$$

Bei der Bestimmung von Absolutwerten der EB von Partikeln muß außerdem noch die Viskosität des Kammerpuffers berücksichtigt werden. Im allgemeinen werden jedoch nur die Relativwerte zwischen den elektrophoretischen Beweglichkeiten der jeweiligen Teilchen angegeben.

3.5.3. SDS-Gelelektrophorese und Charakterisierung der Membranproteine von ghosts und I.O.-Vesikeln

Die Ausführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (20) wurde in Anlehnung an die Methode nach Laemmli (21) durchgeführt. Zur Elektrophorese wurde eine selbstgebaute, kühlbare Apparatur aus Plexiglas für 10 Gelstäbchen verwendet. (Innendurchmesser: 5 mm, Länge 90 mm). Die aufgetragene Gelhöhe in den Gläschen betrug insgesamt ca. 80 mm, wovon 6 mm dem oberen Sammelgel zurechnen sind. Die Gele wurden aus folgenden Stammlösungen zubereitet:

Lösung a) 60 g Acrylamid; 1,6 g N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) mit H₂O bidest. ad 200 ml.

Lösung b) 400 mg SDS (Natriumdodecylsulfat); 18,15 g Tris (0,375 M); 0,1 ml TMED mit HCl auf pH 8,8 einstellen und mit H₂O bidest. ad 200 ml.

Lösung c) 0,4 g SDS; 6,05 g Tris (0,125 M); 0,1 ml TMED mit HCl auf pH 6,8 einstellen und mit H₂O bidest. ad 200 ml.

Lösung d) 2,1 g Ammoniumpersulfat ad 100 ml H₂O bidest.

Das 10 %ige Trenngel wurde wie folgt zubereitet:

10 ml Lösung a, 15 ml Lösung b, 1 ml Lösung d und 4 ml bidest. Wasser werden vermischt. Das entgaste Gel wird dann in unten verschlossene Glasröhrchen auf ca. 75 mm Höhe eingefüllt, mit Wasser überschichtet (zur Begradigung des Meniskus) und polymerisiert. Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 30 min. bei

Raumtemperatur) wird das überschichtete Wasser abgesaugt und das 3 %ige Sammelgel aufgetragen. Zur Herstellung desselben werden 5 ml Lösung c; 0,4 ml Lösung d, 1 ml Lösung a und 3,6 ml bidest Wasser miteinander vermischt, entgast, mit Wasser überschichtet und 30 min. mit UV-Licht polymerisiert.

Die Röhrchen werden in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Elektrophorese-Wanne eingesetzt und die aufgeschlossenen, mit etwas Saccharose versetzten Proben durch vorsichtiges Unterschichten des Elektrodenpuffers auf das Sammelgel aufgetragen. Zum Aufschluß der Proteine wurde ein Puffer folgender Zusammensetzung verwendet: 0,76 g Tris (0,0625 M); 2,0 g SDS (2 %ig) und 5 ml 2-Mercaptoäthanol (5 %ig), pH 6,8, aufgefüllt auf 100 ml. Zum Aufschluß wird etwa 1 ml Probe mit 0,5 ml Aufschlußpuffer 3-4 min. bei 100°C gekocht. Die Lösung muß hernach klar sein (bei Trübung muß erneut gekocht werden). Durch die reduzierende Wirkung des 2-Mercaptoäthanol kommt es zur Spaltung der Disulfid-Brücken. Die in Untereinheiten zerlegten Polypeptidketten bilden unter Einwirkung von Natriumdodecylsulfat Komplexe. In ihnen ist die ursprünglich absolute Ladung aufgehoben, d.h. die Molekulargewichte können aus den relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten dieser Komplexe in Polyacrylamidgelen bestimmt werden (22,23).

Die elektrophoretische Trennung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Elektrodenpuffer: 12,1 g Tris; 57,5 g Glycin und 4,0 g SDS werden mit HCl auf pH 8,3 eingestellt und ad 1000 ml aufgefüllt (= Stammlösung). Die Verdünnung der Stammlösung (1 Teil) mit 3 Teilen H₂O bidest. liefert den verwendeten Elektrodenpuffer.

Auftragsmenge der Proben:	20-200 µl Proteinlösung in 100-180 µl Elektrodenpuffer (+ Saccharose)
Laufrichtung:	zur Anode (⊕ Pol)
Stromverhältnisse:	Anfang: 4 mA und 40 V pro Röhrchen Ende: 3,9 mA und 41 V pro Röhrchen
Laufzeit:	ca. 2 Stunden

Eine als Kontrollsubstanz im Röhrchen mitlaufende 0,001 %ige Bromphenolblaulösung zeigte beim Erreichen des unteren Teils des Röhrchens das Ende des Elektrophoreselaufs an. Die aus den Röhrchen herausgelösten Gele wurden anschließend mit einer 0,1 %igen Coomassie Brilliant Blue R-250-Lösung in 50 %iger TCA gefärbt. Die Anfärbezeit betrug ca. 15-20 min.. Die Entfärbung erfolgte über Nacht in einer 8 %igen Essigsäurelösung im Entfärbebad.

Zum Nachweis der einheitlichen Membranstruktur wurden ghosts und I.O.-Vesikel nach dem Lauf in der trägerfreien Elektrophorese nach der oben beschriebenen Methode aufgeschlossen und auf SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisiert. Von den aufgetrennten Banden im Gel wurden anschließend Diagramme mit dem Gilford 6040-Densitometer (Wellenlänge: 630; Absorption: 1; Abtastgeschwindigkeit: 2 cm/min.) erstellt.

3.6. Mikroskopische Verfahren

3.6.1. Phasenkontrastmikroskopie und Messung der Ghost- und I.O.-Vesikel-Größe

Die morphologische Kontrolle der einzelnen Aufarbeitungs- und Vesikulierschritte erfolgte mit dem Zeiss-Photomikroskop I. Der geringe Kontrast zwischen der Ghostmembran und dem sie umgebenden Puffermedium machte die Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie erforderlich. Die verwendeten Objektive waren das Neofluar 40/0,75 Ph2 160/0,17 und das Neofluar 63/1,25 Oel Ph 3 160/-. Das Okular hatte eine 8fache Vergrößerung. Zu Präparataufnahmen mit dem Blitzlicht (60 Wsec) wurde der Ilford-Film HP 4/135 (24x36) 27-29 DIN verwendet.

Der Ghost- und I.O.-Vesikeldurchmesser wurde im gleichen Mikroskop bestimmt. Die Eichung des Okularmikrometers mit dem Objekt-Netzmikrometer ergab einen Wert von 12,5 Quadraten pro 0,1 mm. Der gemessene Ghostdurchmesser entsprach durchschnittlich der 0,8fachen Länge eines Quadrates. Daraus errechnet sich der mittlere Ghostdurchmesser zu:

$$0,8 \cdot \frac{0,1}{12,5} \text{ (mm)} = \frac{0,08}{12,5} = 0,0064 \text{ mm oder } 6,4 \mu. (r_G = 3,2\mu).$$

Bei den I.O.-Vesikeln erhält man auf analoge Weise einen mittleren Durchmesser von:

$$0,11 \cdot \frac{0,1}{12,5} \text{ (mm)} = 0,00088 \text{ (mm) bzw. } 0,8 \mu. (r_{I.O.} = 0,4\mu).$$

3.6.2. Elektronenmikroskopie

Die Präparate für das Elektronenmikroskop wurden nach dem "positive staining"-Verfahren behandelt. Durch Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid werden die Membranproteine und -lipide zunächst fixiert, anschließend mit absolutem Äthanol entwässert und in Eponharz (Epikote 162/Deutsche Shell Chemie) eingebettet (24). Nach der Polymerisation des Harzes werden mit dem Diamantmesser Schnitte von dem Präparat angefertigt (Ultratome III/LKB), diese auf kohlebedampfte Formvarfilm-Kupfernnetzchen gebracht und mit einer 4 %igen Uranylacetat- sowie Bleicitrat-Lösung (nach Reynolds) doppelkontrastiert. Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit dem Jem-T7 Elektronenmikroskop (JEOL, Tokyo) bei 60 kV. Die Primärvergrößerung betrug 10.000. (Photographische Vergrößerung 2,5fach). Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit dem Agfa-Scientia-film 23 D 56 gemacht und auf Agfa-Normalphotopapier abgezogen.

3.7. Dichtegradientenzentrifugation

Die Abtrennung der geschlossenen (resealed) ghosts, I.O.- und R.O.-Vesikel von den noch offenen (unsealed) erfordert die Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation (8,9). Zu diesem Zweck trägt man die Zellsuspension (1-2 ml pro Gradient) auf eine 3,14 %ige Dextran T110-Lösung in TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, auf. Durch die anschließende Zentrifugation bei 5°C in einer IEC/B-60 im SW-40 Rotor kommt es bei 28 000 UpM (100 000xg)/16 Std. zur Auftrennung in eine obere und eine untere Bande. Durch die Verwendung eines linearen Dextrangradienten anstelle der 3,14 %igen

Dextranlösung kommt es nach der Zentrifugation bei 28 000 UpM (= 100 000xg)/16 Stunden zur Bildung einer weiteren Bande in der Mitte des Gradienten. Die Konzentration des Gradienten erstreckte sich in einem Bereich von 3,14 % bis 13,0 Gew. %. Die beiden Lösungen zum Gradienten wurden wie folgt angesetzt:

Lösung a: 3,24 g + 100 ml TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4

Lösung b: 15,0 g + 100 ml TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4

Von Lösung a und b wurden je 5,5 ml zur Herstellung eines Gradienten im SW 40-Tube verwendet. (Gesamtvolume des Gradienten = 11,0 ml). Zur Ermittlung des Brechungsindex n wurde ein linearer Gradient (Blindwert) unter denselben Bedingungen zentrifugiert und anschließend mit der Schlauchpumpe in 33 Fraktionen à 0,33 ml aufgeteilt. Die Ausmessung der einzelnen Fraktionen mit dem Refraktometer ergab einen Brechungsindexbereich von $n = 1,359$ bis $n = 1,333$.

3.8. Proteinkonzentrationsmessung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Ninhydrin-Methode nach Totalhydrolyse. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen nach der Dichtegradientenfractionierung oder nach dem trägerfreien Elektrophoreselauf wurde mit dem Technikon Auto Analyzer ermittelt (25).

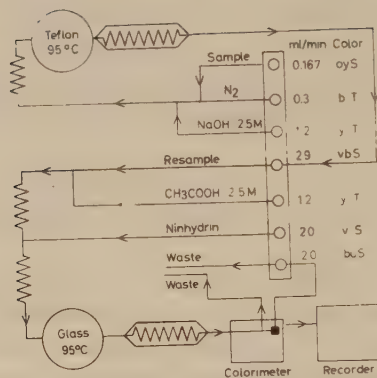
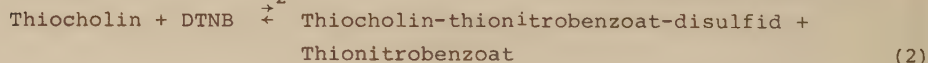
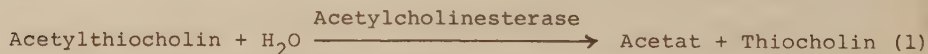


Abb. 6 gibt schematisch den Aufbau des Technikon Auto Analyzers wieder (25).

3.9. Teste zur Lokalisierung von Enzymen auf der Membranoberfläche

3.9.1. Acetylcholinesterase

Die Bestimmung der Acetylcholinesterase erfolgt nach:



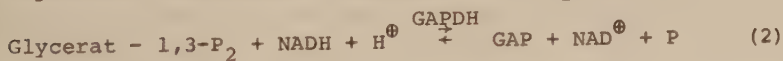
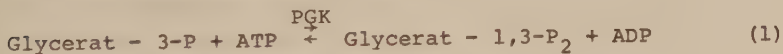
Die proportional der Aktivität der Acetylcholinesterase freigesetzte Menge an Thionitrobenzoat ($\epsilon_{M405} = 13,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$) wird bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm bei 25°C gegen den Leerwert gemessen. Die eingesetzte Probenmenge betrug 0,02 ml, das Endvolumen der Testlösung 3,12 ml. Sowohl bei Lösung 1 wie auch bei Lösung 2 wurden im Gegensatz zur Vorschrift nach Boehringer (26) abgewandelte Puffer eingesetzt. Die 10 mg DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) werden dabei in ca. 60 ml 0,005 M Na-phosphat-

Puffer, pH 7,2, gelöst und mit einer 0,005 M Na_2HPO_4 -Lösung erneut auf den pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Lösung wird dann mit 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 7,2, auf 100 ml aufgefüllt (Lösung 1).

Als Lösung 2 werden 180,4 mg Acetylthiocholinjodid-Lösung (0,156 M) in 4 ml 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 7,2, gelöst. Die Messung der Reaktionskinetik erfolgte mit dem Beckman DB Spectralphotometer in Verbindung mit dem log. Beckman 10 "Recorder" (Laufgeschwindigkeit: 6,6 cm/8 min.). Aus der Steigung der Geraden wurde anschließend die Extinktionszunahme ermittelt (1 Kästchen = $\Delta E = 0,01$) und in Verbindung mit dem jeweiligen Proteinwert die spezifische Aktivität der Acetylcholinesterase berechnet.

3.9.2. Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

Der GAPDH-Test läuft wie folgt ab:

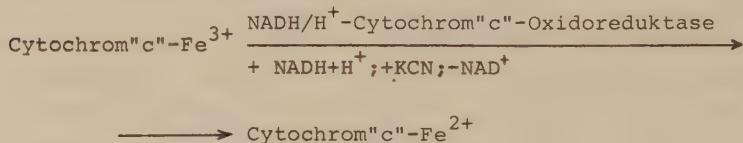


Gemessen wird die NADH-Extinktionsabnahme bei 366 nm (25°C) bei einer Schichtdicke von 1 cm gegen den Leerwert ($\epsilon_{\text{M}366} = 3,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$). Der Test wurde nach der Vorschrift des Boehringer Kontroll-Labors ausgeführt (27,28). Als Abänderung wurde statt dem 0,1 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7,6, der 0,01 M TRA/0,01 M HAC/10⁻⁴ M MgSO_4 -Puffer, pH 7,6, verwendet (Lösung 1). Bei Lösung 5 wurden die 10 mg EDTA, nicht wie in der Vorschrift beschrieben, im 0,1 M TRA-Puffer, pH 7,6, gelöst, sondern in 1 ml 0,01 M TRA/0,01 M HAC-Puffer, pH 7,6.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität von GAPDH erfolgte analog dem Acetylcholinesterase-Test aus der Messung der eingesetzten Proteinmenge und der Steigung der Reaktionskinetikkurve.

3.9.3. NADH/H⁺-Cytochrom" c"-Oxidoreduktase

Die Reduktion von Cytochrom" c" (Fe³⁺) durch NADH/H⁺-Cytochrom" c"-Oxidoreduktase (E.C. 1.6.2.1.) erfolgt nach:



Die Messung wurde bei einer Schichtdicke von 1 cm gegen Luft bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 550 nm ($\epsilon_{\text{M550}} = 27,7 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$) durchgeführt (29).

Zur Bestimmung werden 3,3 mg β -NADH/H⁺ (Lösung 1) und 65 mg Cytochrom" c" (Fe³⁺) (Lösung 2) in je 1 ml 0,005 M Na-phosphat-Puffer (Hämolysepuffer), pH 8,0, gelöst. Lösung 3 wird durch Lösen von 1 mg KCN in 100 ml desselben Puffers hergestellt. Als Reaktionsansatz wird Lösung 3 (3,00 ml) mit den Lösungen 1 (0,02 ml) und 2 (0,02 ml) im Zentrifugenglas vermischt. Durch Zugabe der Probe wird die Reaktion gestartet und anschließend die Extinktionszunahme in 1 cm-Küvetten gemessen. Die spezifische Aktivität wurde sodann durch die Berechnung der Steigung der Reaktionskinetikkurve und aus dem Proteingehalt der Probe ermittelt.

3.10. N-Acetyl-neuraminsäure-Gehalt auf der Membranoberfläche

3.10.1. Abspaltung der Neuraminsäure durch Trypsin

Die Bestimmung der N-Acetyl-neuraminsäure setzt voraus, daß sie nicht mehr in der Membran verborgen oder an die Membranamatrix gebunden vorliegt. Zu diesem Zweck werden die geschlossenen (released) Ghost- und I.O.-Vesikelmembranen in TRA-HAC-Puffer, pH 7,4, mit Trypsin (8) bei 37°C 60 min. lang behandelt (1,25 mg Trypure Novo auf 10 mg Protein), um die Neuraminsäure in Form von Sialopeptiden abzuspalten. Die Inkubationslösung wird anschließend in der IEC/B-60 bei

50 000xg 15 min. lang zentrifugiert. Der Überstand mit den abgespaltenen Neuraminsäure-Peptiden wird vom Pellet abgetrennt, hydrolysiert und aus dem Hydrolysat der Gehalt an freier Neuraminsäure bestimmt. Das Pellet enthält die vor enzymatischer Abspaltung geschützte N-Acetyl-neuraminsäure auf der Membranınnen-seite gebunden. Es wird ebenfalls hydrolysiert und danach der Neuraminsäuregehalt ermittelt.

3.10.2. Abspaltung der Neuraminsäure durch Neuraminidase

Eine spezifischere Abspaltung der N-Acetyl-neuraminsäure von der Membranoberfläche erreicht man mit Neuraminidase aus *Vibrio comma* (cholerae)/Behringwerke AG (1 ml $\hat{=}$ 500 Einheiten). Die Neuraminsäureabspaltung erfolgt im folgenden Puffer: 20 mM Naphosphat-Puffer, pH 6,4 + 1 mM CaCl_2 . Die Partikel werden vor der enzymatischen Behandlung einmal mit diesem Puffer gewaschen und dann nach Zugabe von 0,05 ml ($\hat{=}$ 25 Neuraminidase-Einheiten/2-3 mg Protein in 1 ml Puffer) Neuraminidaselösung bei 37°C inkubiert (30). Nach einer Inkubationszeit von 35 min. werden die Partikel bei 50 000xg/15 min. lang zentrifugiert. Aus dem Pellet und dem Überstand wird anschließend der Neuraminsäuregehalt bestimmt.

3.10.3. Bestimmung der N-Acetyl-neuraminsäure

3.10.3.1. Hydrolyse

Es wurden jeweils 1 ml Probe mit 1 ml 0,2 N H_2SO_4 versetzt und bei 80°C eine Stunde im Wasserbad hydrolysiert. Die Neutralisation erfolgte nach der Hydrolyse durch Zugabe von 0,5 ml 0,4 N NaOH.

3.10.3.2. Warren-Test auf N-Acetyl-neuraminsäure

Zur Neuraminsäurebestimmung nach L. Warren (31,32) wurden 0,2-0,4 ml hydrolysierte Probe eingesetzt. Abweichend vom Warren-Test (31) wurde der Probe 0,1 ml 0,2 M Natriumperjodat-Lösung zugesetzt. Der am Ende des Tests mit Cyclohexanon ausgeschüttelte rote Farbkomplex wurde bei 549 μm in 1 cm Küvetten gegen Cyclo-

hexanon gemessen.

Zur Ermittlung des N-Acetyl-neuraminsäure-Gehalts aus den gemessenen Extinktionswerten wurde im Bereich von 2-90 γ Neuraminsäure eine Eichkurve erstellt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an N-Acetyl-neuraminsäure, reinst, synthetisch 99 % (Serva) denselben Hydrolysebedingungen (3.10.3.1.) unterworfen und nach dem anschließenden Thiobarbitursäuretest (nach Warren) die dazugehörigen Extinktionswerte bestimmt. Die gezeichnete Eichkurve zeigt im Bereich von 2-90 γ eine lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Neuraminsäuremenge ($E \times 162,5 = \mu\text{g Neuraminsäure/ml}$).

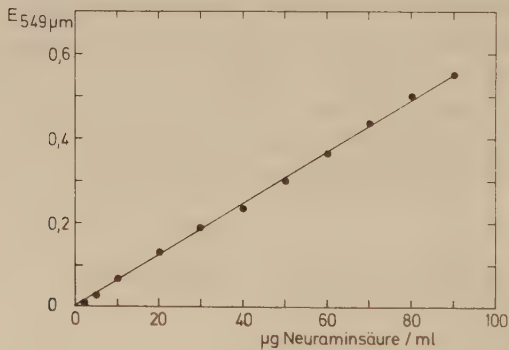


Abb. 7 Eichkurve zur Neuraminsäurebestimmung nach Warren

3.11. Bestimmung des Oberflächenladungsanteils von N-Acetyl-neuraminsäure auf der Ghostoberfläche

Ghosts wurden zu gleichen Teilen einmal mit (3.10.2.) und einmal ohne Neuraminidase behandelt und anschließend auf die trägerfreie Elektrophorese gegeben. Beide Elektrophoreseläufe wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt ($I = 100 \text{ mA}$; $U = 1,2 \text{ kV}$; $t = 5^\circ\text{C}$; 96fach Absaugpumpe: 2,25 ml/Fr./Std. und Dosier-

pumpe: 3,75 ml/Std.). Auf Grund der unterschiedlichen Oberflächenladung beider Ghosttypen kommt es bei beiden Läufen zu unterschiedlichen Ablenkungen zur Anode hin (33). Die Ablenkungen wurden am Kammerende zum Lot der Einspritzstelle gemessen. Sie betrug für ghosts 6,4 cm und für Neuraminidase-behandelte ghosts 3,55 cm. Aus beiden Werten läßt sich mit Hilfe der Kammermaße ($L = 37,1$ cm; $B = 12,8$ cm; $V_K = 20,1$ ml; Kammerpaltdicke: 0,424 mm) und der Aufenthaltsdauer

$$t = \frac{2}{3} \cdot \frac{V_K}{D_P}$$

der Partikel im elektrischen Feld die Abnahme der Oberflächenladung berechnen. Sie ist proportional der abgespaltenen Neuraminsäuremoleküle, d.h. die prozentuale Ladungsabnahme entspricht in etwa dem Ladungsbeitrag an gebundener N-Acetyl-neuraminsäure auf der Außenseite der Ghostmembran. Aus der obigen Formel ergibt sich für die Partikel im elektrischen Feld eine Aufenthaltsdauer von:

$$t = \frac{2 \cdot 20,1 \cdot 3600}{3 \cdot 2,25 \cdot 96} = 222,34 \text{ (sec)}$$

V_K = Kammervolumen

D_P = Saugleistung der 96fach Pumpe ($\frac{96 \cdot 2,25}{3600}$ ml/Fr./sec)

Die Beweglichkeit v der Teilchen im elektrischen Feld erhält man durch das Einsetzen der gemessenen Werte in folgende Gleichung:

$$v = \frac{\text{Wandergeschwindigkeit} \left\{ \frac{s}{t} \right\}}{\text{elektrische Feldstärke} \left\{ \frac{U}{B} \right\}}$$

s = Ablenkung zur Anode (cm)

t = Zeit im elektrischen Feld (sec)

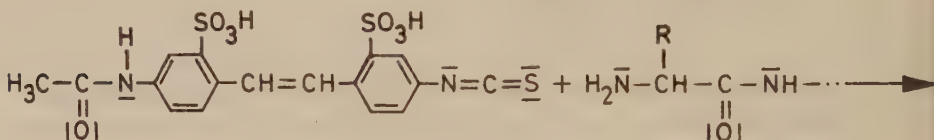
U = Spannung (V)

B = Kammerbreite (cm)

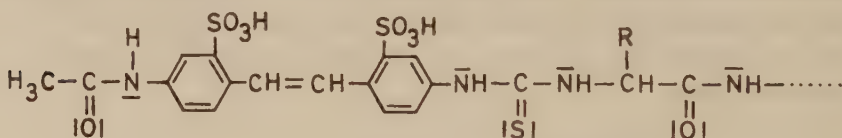
3.12. SITS-Markierung der Ghostmembran

Zum Beweis für eine echte I.O.-Vesikulierung wurde die Membranoberfläche mit SITS (= 4-Acetamido-4'-isothiocyano-stilben-

2,2'-Disulfonsäure) markiert (34,35). Die reaktive Gruppe dieses Membran-Markers ist die endständige Isothiocyanat-Gruppe. Sie reagiert im wässrigen Milieu unter schonenden Reaktionsbedingungen mit Amino-, Sulfhydryl-, Tyrosyl-, Histidyl- und gelegentlich mit Guanidyl-Gruppen. Die mittlere Aufnahme von SITS pro ml packed cells beträgt hierbei $12 (\pm 6) \cdot 10^{-9}$ Mol SITS (34). Die Fixierung des Markers an die oben angeführten Gruppen erfolgt durch kovalente Bindung. Sie läuft nach folgendem Schema ab:



SITS (=4-Acetamido-4'-isothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure) MG:552,53



Hämolysierte ghosts wurden mit Hilfe von Promethazin-HCl (10^{-3}M) bei $36^\circ\text{C}/90$ min. resealed und nach innen vesikuliert (3.3.2.). Die I.O.-vesikulierten ghosts (ca. 2 ml) wurden sodann 1 Mal mit TRA-HAC- Mg^{++} -Puffer, pH 7,4, gewaschen, auf eine 2,5 %ige Dextran T-110-Lösung aufgetragen und bei 17 000 UpM (= 30 000xg)/2 Std. in der IEC/B-60 (SW 40) bei 4°C zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation abgetrennte obere Bande wird zur Entfernung des restlichen Dextrans 2 Mal mit TRA-HAC- Mg^{++} -Puffer bei 13 000 UpM (= 20 200xg)/10 min. (4°C) in der Sorvall (Rotor SS 34) gewaschen. Die so erhaltenen geschlossenen, vesikulierten ghosts wurden sodann in der trägerfreien Elektrophorese elektrophoretisch gereinigt, anschließend mit 25 nmol SITS/ml-Ghostsuspension (Minimum 12 nmol/ml packed cells) versetzt und 3 min. bei 20°C inkubiert. Zur Entfernung des SITS-Überschusses wurden die markierten ghosts solange mit TRA-HAC- Mg^{++} -Puffer bei 13 000 UpM (= 20 200xg)/10 min. (Sorvall SS 34) gewaschen (insgesamt 6 Mal), bis unter der UV-Lampe keine Fluoreszenz mehr im Überstand zu erkennen war.

Nach dreimaliger Homogenisation mit der 27-gauge hypodermic Nadel (3.4.) folgte abermals ein Lauf in der Elektrophorese. Man beobachtet zwei Banden. Von den einzelnen Fraktionen aus dem Elektrophoreselauf wurden anschließend die Proteinwerte bestimmt und die dazugehörigen Fluoreszenzemissionen bei 490 nm gemessen.

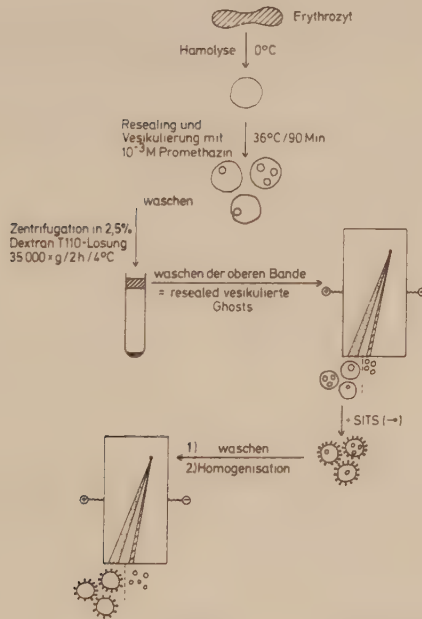


Abb. 8 Schematische Darstellung der Behandlung von I.O.-vesikulierten ghosts mit SITS.

3.12.1. Fluoreszenzmessung

Zur Fluoreszenzmessung wurde die Probe mit 28 %iger KOH (1:1) versetzt und die Fluoreszenz nach 30 sec abgelesen. Die Messung erfolgte mit dem Perkin Elmer Fluoreszenz-Spektrophotometer MPF-2A (Anregungswellenlänge: 350 nm; maximale Emission bei 490 nm; Spalt: 10 nm; Sensitivity: 4). Zur Aufzeichnung des Emissionsmaximums von SITS wurde ein an das Spektrometer angeschlossener Hitachi Recorder QPD₃₃ verwendet.

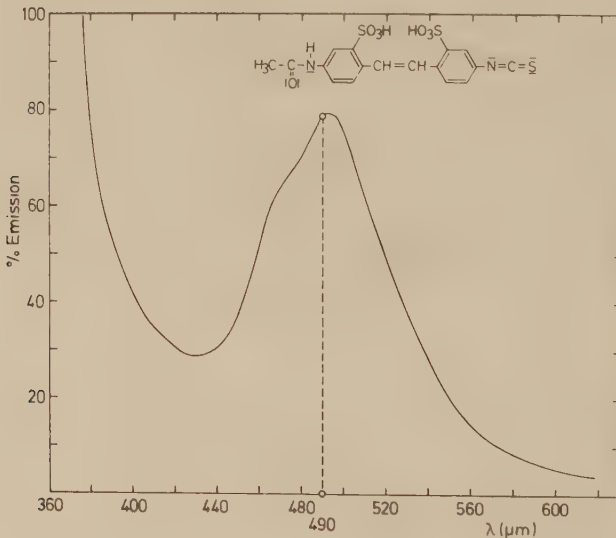


Abb. 9 Emissionsspektrum von SITS

3.13. Inkubation von I.O.-Vesikeln und ghosts mit Virus influenza

Die nach der Dichtegradientenzentrifugation (3.7.) und Elektrophorese (3.5.1.3.) erhaltenen I.O.-Vesikel und Ghost- (bzw. R.O.-) Suspensionen werden zunächst auf gleiche Konzentrationen einge-

stellt. Dies erfolgt durch Trübungsmessungen der Suspensionen im Spektralphotometer in 1 cm Quarzküvetten bei der Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$. Beide Fraktionen werden anschließend mit Puffer auf einen Extinktionswert E von etwa 0,8 gebracht. Von der nun folgenden Verdünnungsreihe der Ghost- bzw. I.O.-Vesikel-Suspension (Verdünnung: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 ...) werden jeweils 50 μl (bzw. 100 μl) entnommen und mit 0,45 ml PBS sowie 50 μl Virus influenza-Lösung (4 000 HAU/ml, APR 8-Stamm) versetzt. Die Inkubation bei 4°C dauert 1 Stunde. Von der Inkubationslösung werden sodann kleine Probenmengen entnommen und diese zur Betrachtung im Elektronenmikroskop nach der "negative staining"-Methode behandelt. Dies erfolgt mit 2,5 %iger Ammoniummolybat-Lösung, pH 7,4 und 2 %iger Phosphorwolframsäure, pH 7,4, auf Kollodiumfilm-Kupfernetzchen.

4. Ergebnisse =====

4.1. Präparations- und Trennungsmethoden der Membranen

4.1.1. Ausbeute und Lagerfähigkeit von Erythrozytenghosts

Die Aufarbeitung von 80 ml Frischblut ergab nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Ghostpräparation bei 20 200xg/10 min. eine Ausbeute von ungefähr 40,0 ml Ghostsuspension. Die Proteinkonzentration dieser Standardsuspension lag hierbei zwischen 3,2 und 3,5 mg pro ml Lösung. Die ghosts hatten eine weiße Farbe, d.h. alles Hämoglobin wurde bei den Waschschritten restlos entfernt.

Die Lagerung der ghosts in 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 8,0, erfolgt nach der Aufarbeitung bei 0°C. Nach 3,5 und 8 Tagen wurden Proben aus der Suspension entnommen und im Phasenkontrastmikroskop (3.6.1.) untersucht. Es konnten dabei keinerlei morphologische Veränderungen der Ghostmembran beobachtet werden. Ghosts sind im pH-Bereich von 6,0 bis 9,0 relativ stabil. Sie sind wesentlich empfindlicher auf Schwankungen in der Puffer-Ionenkonzentration.

Proben wurden außerdem an den oben angeführten Tagen entnommen, mit Primaquine-Diphosphat-Lösung ($2 \cdot 10^{-3}$ M) im Verhältnis 1:1 versetzt und bei 36°C im Wasserbad 90 min. inkubiert. Auch hierbei wurde keine Abnahme der Vesikulierbereitschaft festgestellt.

4.1.2. I.O.-Vesikulierung unter unterschiedlichen Bedingungen

1. Stabilisierung der ghosts mit Vitamin A, Primaquine oder Promethazin.

Während ghosts in 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, bei 0°C für längere Zeit beständig sind (4.1.1.), zerfallen sie bei der Inkubation (36°C/90 min.) im selben Medium spontan in Bruchstücke. Durch die Zugabe von Vitamin A, Primaquine-Diphosphat, Promethazin-HCl bzw. Prochlorperazin-Dimaleat beobachtet man

hingegen unter den gleichen Bedingungen ($36^{\circ}\text{C}/90 \text{ min.}$) keinen Zerfall während des I.O.-Vesikulierungsprozesses. Ph. Seeman (14) konnte durch Untersuchungen mit verschiedenen Reagenzien (Promethazin, Prochlorperazin etc.) zeigen, daß diese mit der Erythrozytenmembran in Wechselwirkung treten. Dies erklärt auch, weshalb diese Stoffe dem Zerfall entgegenwirken und in bestimmten Konzentrationen eine schrittweise Membraneinstülpung bewirken.

Im Experiment 3.3.2.1. wurde untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Vesikulierungsgrad der Membran und der Konzentration an Primaquine bzw. Promethazin besteht. Hierbei zeigt sich, daß sich in einem bestimmten molaren Konzentrationsbereich c sowohl für Primaquine als auch für Promethazin ein Optimum der Membranvesikulierung ausbildet. Es liegt bei beiden Reagenzien in einem Bereich von $c = 5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. In der Abb. 10 ist die Abhängigkeit zwischen der molaren Konzentration der Stoffe und der Vesikulierung der Zellmembran graphisch dargestellt. Auf der Abszissenachse ist die molare Endkonzentration an Primaquine-Diphosphat bzw. Promethazin-HCl in 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, wiedergegeben; auf der Ordinatenachse die Zahl der intakten, vesikulierten Zellen in Prozent. Sie wurden jeweils im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und auf die ursprünglich eingesezte Zellzahl (100 %) bezogen und berechnet.

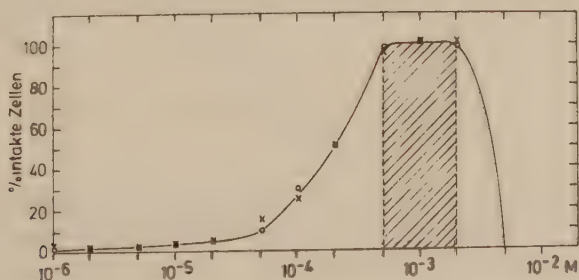
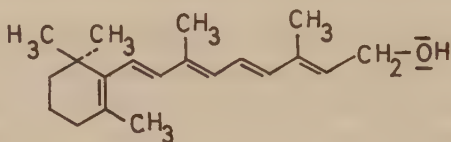


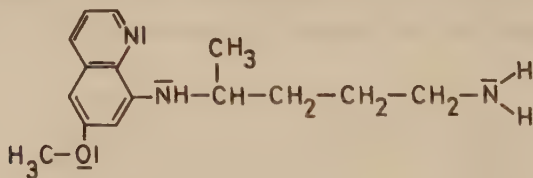
Abb. 10 Vesikulierung der Ghostmembran in Abhängigkeit verschiedener molarer Konzentrationen an Primaquine-Diphosphat (+—+) und Promethazin-HCl (o—o). Im Bereich des schraffierten Feldes beobachtet man die stärkste I.O.-Vesikulierung und Stabilisierung der Ghostmembran.

Von den möglichen Reagenzien, die die I.O.-Vesikulierung fördern, soll zunächst das Vitamin A₁ (Retinol), C₂₀H₃₀O, erwähnt werden. Es zeigt bei der I.O.-Vesikulierung dieselbe Wirkung wie die folgenden drei Verbindungen Primaquine, Promethazin und Prochlorperazin. Vitamin A₁ ist ein monozyklischer, ungesättigter primärer Alkohol mit folgender Konstitution:



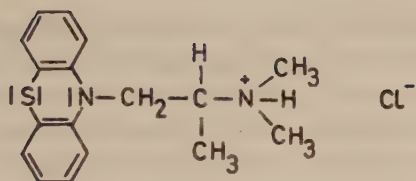
Vitamin A₁ (Retinol) (MG: 286,46)

Primaquine, C₁₅N₃OH₂₁, (= 8-{4-Amino-pentylamino}-6-methoxy-chinolin) gehört zur Gruppe der malariewirksamen 8-Aminochinolin-Derivate. Am Chinolinring sitzt in 6-Stellung eine Methoxygruppe und in 8-Stellung eine Aminogruppe. Letztere ist durch eine aliphatische Seitenkette mit der endständigen primären Aminogruppe verbunden. Die Verbindung besitzt folgende Konfiguration:



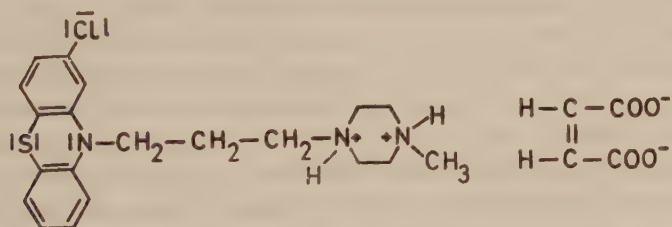
Primaquine (MG 259,35)

Die Verbindung Promethazin-HCl, C₁₇N₂SH₂₀ · HCl, (=10-{2-Dimethylaminopropyl}-phenothiazin-HCl) zählt zur therapeutischen Klasse der Antihistamine und Tranquilizer. Das Grundgerüst dieser Verbindung ist ein Phenothiazin-Ring, der in 10-Stellung eine aliphatische 2-Dimethylaminopropyl-Kette trägt. Das Promethazin-HCl hat folgende Struktur:



Promethazin-HCl (MG: 320,88)

Außer den drei zuvor behandelten Reagenzien Vitamin A, Primaquine, Promethazin und Prochlorperazin übt Prochlorperazin-Dimaleat, $C_{20}N_3 S Cl H \cdot C_4O_4H_2$ (= 2-Chloro-10-{3-(4-methylpiperazin-1yl)propyl}-phenothiazin-Dimaleat) ebenfalls einen membranvesikulierenden Effekt aus. Es besitzt analog dem Promethazin-HCl einen Phenothiazin-Ring und ist ebenfalls ein Tranquilizer. Die Seitenkette sitzt an der Stelle 10 und der Ring ist außerdem noch an der Stelle 2 chloriert. Das Molekül weist folgenden Bau auf:



Prochlorperazin-Dimaleat (MG 490,02)

2. Vesikulierung in Abhängigkeit von ATP (^{14}C).

Bei der I.O.-Vesikulierung der ghosts unter Mitwirkung von ATP (10) müssen zweierlei Voraussetzungen erfüllt werden. Einmal muß das von außen zugeführte elektrisch hochgeladene ATP durch die Zellwand zu den auf der Innenseite der Zellmembran liegenden ATP-asen gelangen. Zum anderen muß das ATP zu einem Zeitpunkt des Aufarbeitungsgangs zugegeben werden, in dem es vom unsealed ghost aufgenommen wird und nicht wieder herausgewaschen werden kann. Der Zusatz des Adenosintriphosphats (3 mM) neben 1 mM

MgSO₄ während der Hämolyse (nach Penniston) hat wenig Sinn, da der Stoffaustausch durch die vorliegenden unsealed Membranen zwar leicht erfolgen kann, die aufgenommenen Stoffe jedoch bei den darauffolgenden Waschschritten genauso leicht wieder herausgewaschen werden. Dies wird deutlich durch Versuche mit ¹⁴C-markiertem ATP gezeigt. Derartig behandelte ghosts weisen nach den 6 Waschgängen eine Aktivität an β -Strahlung auf (27 Imp./min.), die gleich der Nullrate ist (24 Imp./min.). Aus diesem Grund kann die darauffolgende positive I.O.-Vesikulierung mit Primaquine bzw. Promethazin bei 36°C/90 min. nicht auf die ursprüngliche Zugabe von ATP/Mg⁺⁺ zurückgeführt werden.

Eine weit größere Zählrate erhält man, wenn das ¹⁴C-markierte ATP während der Primaquine- bzw. Promethazin-Behandlung bei 36°C/90 min. zugegeben wird. Da die Wärmebehandlung zum resealing der Membran führt, wird das radioaktive ATP in die Zelle eingeschlossen. Zur Entfernung des restlichen Adenosintriphosphats in der Inkubationslösung werden die Zellen anschließend 6 Mal mit 0,005 M Na-phosphat-Puffer gewaschen. Die Messungen im Szintillationszähler ergaben hierbei Zählraten zwischen 370 und 390 Imp./min.. Somit ist klar bewiesen, daß die Zelle während der Inkubation ATP aufgenommen und eingeschlossen hat. Die gemeinsame Verwendung von Primaquine bzw. Promethazin mit ATP/Mg⁺⁺ zeigte im Fall des Zusatzes von Primaquine keine Tendenz der Membran, sich nach innen zu stülpen, obwohl durch den radioaktiven Marker klar bewiesen werden konnte, daß ATP im ghost eingeschlossen worden ist.

Der vorherige Zusatz von Hexokinase (40 mg HK/100 ml) und Glucose (10 mM) bei der Hämolyse und die darauffolgende Inkubation bei 36°C/90 min. mit markiertem ATP (3 mM) und MgSO₄ (1 mM) neben Primaquine (2·10⁻³ M) oder Promethazin (10⁻³ M) liefert zwar eine hohe Zählrate um 320 Imp./Min., jedoch ist in keinem der beiden genannten Fälle eine I.O.-Vesikelbildung zu beobachten. Ebenso verhält es sich auch bei der Inkubation von ghosts mit 3 mM ATP und 1 mM MgSO₄ ohne Zugabe von Primaquine oder Promethazin.

3. Einfluß des Puffers auf die I.O.-Vesikulierung.

Da möglicherweise die Zusammensetzung des Puffers einen entscheidenden Einfluß auf die I.O.-Vesikulierung ausübt, wurden ghosts mit und ohne Zusatz von $2 \cdot 10^{-3}$ M Primaquine-Diphosphat (Verhältnis 1:1) in verschiedenen Puffern (Tris, pH 8,0 (1N HCl); $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0; TES, pH 7,4 (2N NaOH); TRICIN, pH 7,4 (2N NaOH); HEPES, pH 7,4 (2N NaOH) bei unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 M; 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M; 0,001 M) inkubiert. Hierbei zeigt sich, daß manche Puffer in bestimmten Konzentrationen eine I.O.-Vesikulierung bewirken und die Ghostmembran während der Inkubation bei $36^\circ\text{C}/90$ min. stabilisieren. Bei folgenden angeführten Puffern beobachtet man eine ausgeprägte Bereitschaft der ghosts zur I.O.-Vesikulierung: 0,01 M Tris, pH 8,0 (20 mOsm); 0,01 M TES, pH 7,4 (20 mOsm); 0,01 M HEPES, pH 7,4 (19 mOsm); sowie 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0 + $2 \cdot 10^{-3}$ M Primaquine-Diphosphat (18 mOsm); 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0 + 10^{-3} M Promethazin-HCl (17 mOsm); 0,005 M Tris, pH 8,0 + $2 \cdot 10^{-3}$ M Primaquine-Diphosphat (18 mOsm). Wie den in Klammern angeführten Osmolaritätswerten zu entnehmen ist, liegen alle Werte im engen Bereich zwischen 17-20 mOsm. Bei steigender Pufferkonzentration beobachtet man ebenfalls noch eine Vesikulierung nach innen. Sie ist jedoch zu gering, um eine ausreichende Anzahl an I.O.-Vesikeln zu bekommen. Die Osmolarität der Puffer, bei der noch eine schwache I.O.-Vesikulierung nachgewiesen werden kann, erstreckt sich dabei von 30-75 mOsm. Die jeweiligen Puffer sind im einzelnen: 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,0 (30 mOsm); 0,05 M HEPES, pH 7,4 (75 mOsm); 0,05 M TRICIN, pH 7,4 (67 mOsm).

4. I.O.-Vesikulierung bei unterschiedlichen Temperaturen.

Zum weiteren Studium der I.O.-Vesikulierung wurden ghosts mit einer $2 \cdot 10^{-3}$ M Primaquine- bzw. 10^{-3} M Promethazininlösung in 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0, im Verhältnis 1:1 versetzt und bei 36°C sowie 0°C 90 min. lang behandelt. In beiden Fällen zeigt sich nach der Homogenisation mit der Nadel und dem anschließenden Elektrophoreselauf die gleiche Verteilung an R.O.-Partikeln (ghosts) und I.O.-Vesikeln. Daraus geht eindeutig hervor, daß es sich bei dem Vesikulierprozeß um einen passiven, nicht temperaturabhängigen Vorgang handelt. Die Wärme-

behandlung (36°C) ist nur erforderlich, um wiedergeschlossene (resealed) Partikel (3.2.2.) zu erhalten. Die folgende Abb. 11 zeigt sowohl für Primaquine als auch für Promethazin die Protein-konzentrationsdiagramme der Elektrophoreseläufe nach der Behandlung bei 0°C und $36^{\circ}\text{C}/90\text{ min.}$

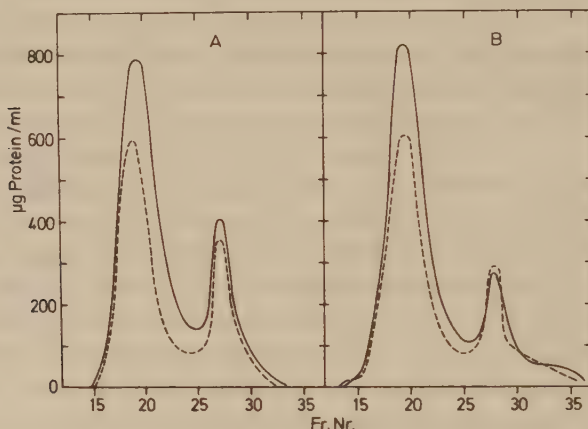


Abb. 11 I.O.-Vesikulierung mit $2 \cdot 10^{-3}$ M Primaquine-Diphosphat (A) und 10^{-3} M Promethazin-HCl (B) bei 0°C (---) und 36°C (—) / 90 min.

4.1.3. Inkubation der ghosts bei verschiedenen Temperaturen (resealing)

Trägt man die bei $0-4^{\circ}\text{C}$ gewaschenen ghosts (3.2.1.) auf den linearen Dextran T 110-Dichtegradienten in TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, auf (3.7.) und zentrifugiert bei 100 000xg 16 Stunden lang, so erhält man eine Bande am Boden des Zentrifugenröhrchens. Inkubiert man die Ghostmembran jedoch zuvor bei $36^{\circ}\text{C}/1\text{ Std.}$, so kommt es nach obiger Zentrifugation zu einer Aufspaltung in zwei Banden. Man beobachtet hierbei außer der ursprünglichen Bande am Boden des Gradienten eine weitere Bande, die auf dem Gradienten sitzt. Die Erklärung für dieses temperaturabhängige

Verhalten ist, daß die Ghostmembran sich nach der Hämolyse bei 0°C - 4°C nicht mehr vollkommen schließt, so daß Stoffe von außen ins Innere der Zelle eindringen können. Bei der Zentrifugation kommt es infolge des eindringenden Dextrans zu einer Dichteerhöhung des Partikels (Equilibrierung), wodurch dieses im Zentrifugenröhrchen nach unten wandert. Durch die Wärmebehandlung der ghosts bei $36^{\circ}\text{C}/1$ Std. jedoch schließt sich eine bestimmte Anzahl an Ghostmembranen wieder vollkommen (9), d.h. Dextran T 110 kann bei der Zentrifugation in diese wiedergeschlossenen (resealed) Partikel nicht mehr eindringen. Sie bleiben auf Grund ihrer geringeren Dichte oben auf dem Gradientenkissen sitzen und werden somit von den nach unten wandernden unsealed ghosts abgetrennt. Im Versuch 3.2.2.1. sollte eine Beziehung zwischen verschiedenen Temperaturen und dem Grad des resealings herausgefunden werden. Zu diesem Zweck wurden gleiche Mengen an ghosts bei unterschiedlichen Temperaturen eine Stunde lang im Wasserbad inkubiert und anschließend bei $100\ 000\times g$ 16 Std. lang auf einem linearen Dextran T 110-Dichtegradienten (3.7.) zentrifugiert. Die folgende Abbildung 12 zeigt die Proteinkonzentrationsverteilung nach der Fraktionierung des Gradienten, wobei die peaks auf der rechten Seite den oberen Banden der Dichtegradienten entsprechen. Die bei 36°C behandelten ghosts bilden von allen drei Gradienten die stärkste obere Bande, was auf die größte Ausbeute an geschlossenen (resealed) Ghostmembranen schließen läßt.

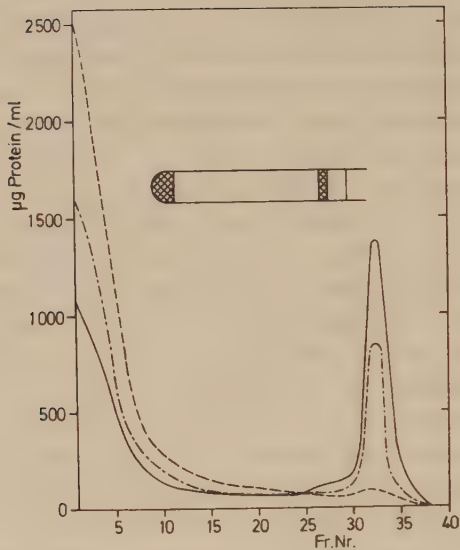


Abb. 12 Proteinkonzentrationsverteilung auf dem Dichtegradienten nach dem resealing der Ghostmembran bei 32°C (|---|); 34°C (|-...-|) und 36°C (|—|).

4.1.4. Homogenisationsmethoden

Zur Homogenisation der vesikulierten ghosts standen drei Methoden zur Wahl:

- a) mit dem Ultraschallgerät (Sonifier)
- b) mit der French Press und
- c) mit der 27-gauge hypodermic Nadel

Versuche mit Ultraschall ergaben, daß durch die Beschallung der Membran (Microtip, Stellung 7, 1 sec) immer mehr unkontrollierte Abspaltungen von der Membranoberfläche erfolgen. Dies zeigt sich einerseits durch das Fehlen von Proteinbanden bei der SDS-Gelelektrophorese und andererseits beobachtet man eine Auf-

spaltung und Verschiebung der Ghostbande in der trägerfreien Elektrophorese in Richtung zur Kathode ($\ominus$ Pol) hin. Daraus läßt sich schließen, daß Träger negativer Ladung, z.B. Sialoproteine etc., abgespalten worden sind (Abb. 13B).

Die Behandlung der vesikulierten ghosts mit der French Press brachte ebenfalls keinen Erfolg. Das dabei erhaltene Homogenat bestand aus einer Mischung von Membranbruchstücken und war somit für weitere Versuche unbrauchbar. In der Elektrophorese zeigte sich dies durch starke Aggregation an.

Als beste Methode stellte sich die Homogenisation mit der 27-gauge hypodermic Nadel heraus (3.4.). Die Ghostsuspension wird hierbei 3 Mal vorsichtig durch eine Kanüle mit einem kleinen Innenquerschnitt gepreßt. Infolge der Scherkräfte in der dünnen Nadel kommt es zur Abspaltung der R.O.-Vesikel von der Zelloberfläche bzw. zur Öffnung der Membran, so daß die I.O.-Vesikel freigesetzt werden. Der Lauf in der trägerfreien Elektrophorese und die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Elektrophoresefraktionen zeigen deutlich, daß sich bei der Homogenisation mit der Nadel keine Bruchstücke gebildet haben (Abb. 13A). Auch gelelektrophoretisch lassen sich keine Veränderungen erkennen.

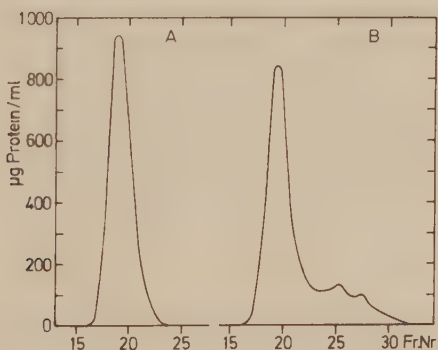


Abb. 13 A Ghosts nach dreimaliger Homogenisation mit der 27-gauge hypodermic Nadel;

Abb. 13 B Ghosts nach der Homogenisation mit dem Ultraschallgerät Microtip/Stellung 7, 1 sec.

4.1.5. Dichtegradientenzentrifugation

In Analogie zu den unsealed (3.2.1.) und resealed ghosts (3.2.2.) erhält man nach der Vesikulierung und Homogenisation von ghosts sowohl unsealed als auch resealed I.O.- und R.O.-Vesikel. Da die Membranen der Vesikel aus denen der ghosts hervorgegangen sind, ist es auch erklärlich, daß sich ebenfalls nur ein gewisser Teil der Vesikel wieder vollkommen schließt. Die Abtrennung der resealed ghosts, I.O.- und R.O.-Vesikel von den unsealed Partikeln erfolgt wiederum mit dem linearen Dextran T 110-Gradienten (3,14-13,0 Gew. %). Die Zentrifugation von 11 ml Gradientenlösung mit ca. 2 ml aufgetragener Suspension bei 100 000xg/16 Std. liefert insgesamt drei Banden (Abb. 14). Die obere Bande (3) zeigt bei der Betrachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop ein Gemisch von kleinen Vesikeln und die bei der Homogenisation heil gebliebenen Ghostzellen. Die schwache mittlere Bande (2), die gelegentlich bei Trennungen auftritt, enthält möglicherweise Artefakte aus der Aufarbeitung. Die Ausbeute an Partikeln war zu gering, um eine klare Aussage über diese Bande machen zu können. In der unteren Bande (1) findet man neben den unsealed Vesikeln auch die nach der Homogenisation nicht wieder geschlossenen Ghostmembranen. Sowohl bei der I.O.- wie auch R.O.-Vesikulierung erhält man dasselbe Bild der Proteinkonzentrationsverteilung im Gradienten.

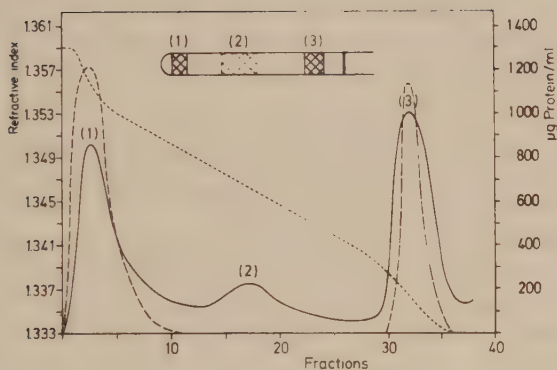


Abb. 14

zeigt die drei Banden des Dichtegradienten nach der Zentrifugation eines Homogenates von Primaquine-behandelten Erythrozytenghosts. Die obere (3) und untere Bande (1) wurden nach dreimaligem Waschen anschließend auf die trägerfreie Elektrophorese gegeben (4.1.6.).

(|—|) Proteinkonzentrationsverteilung von Primaquine-behandelten ghosts (I.O.-Vesikulierung).

(| - - |) Proteinkonzentrationsverteilung von wärme-behandelten ghosts (36°C/1 Std.).

Untere Bande (1) unsealed ghosts

Obere Bande (3) resealed ghosts

(|...|) Dextran T 110-Konzentration im Gradienten als Funktion der Brechungsindizes aufgetragen.

4.1.6. Elektrophoretische Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln

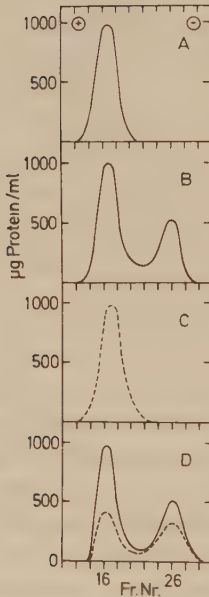


Abb. 15

Trennungsdiagramme von trägerfreien Elektrophoreseläufen (Proteinverteilungskurven) (36).

Unbehandelte ghosts (A), Primaquine-behandelte ghosts - I.O.-Vesikulierung - (B), ITP/HK/Glucose-behandelte ghosts - R.O. Vesikulierung - (C) und Primaquine-behandelte ghosts nach der Dichtegradientenzentrifugation (D).

(| - - |) Obere Bande des Dichtegradienten;
(| — |) untere Bande des Dichtegradienten.

Durch die unterschiedliche Ladungsverteilung auf beiden Membranseiten des Erythrozyten, bedingt durch die unterschiedliche Verteilung der Neuraminsäure (4.2.4.), bietet sich die trägerfreie Elektrophorese als geeignete Methode an, um die weniger stark geladenen I.O.-Vesikel von den höher geladenen ghosts bzw. R.O.-Partikeln abzutrennen (3.5.1.3.) (36-38).

A ist das Diagramm von unbehandelten resealed oder unsealed ghosts. Sie werden von der Einspritzstelle aus (ungefähr über der Fraktion 65) in die Fraktionen 15-18 mit dem Maximum bei Fraktion 16 abgelenkt. Infolge der gleichen Oberflächenladung der resealed und unsealed ghosts beobachtet man in der Elektrophorese eine einzige Bande. Anders hingegen verhält es sich, wenn man das

Homogenat nach der I.O.-Vesikulierung im elektrischen Feld laufen läßt. Hierbei kommt es zu einer Aufspaltung in zwei Banden, deren Maxima ungefähr 10 Fraktionen auseinanderliegen (B). Während die Partikel der linken Bande dieselbe Oberflächenladung wie intakte ghosts besitzen, werden die schwächer geladenen I.O.-Vesikel (Abb. 4) weniger stark zur Anode hin abgelenkt. Sie sammeln sich in den Fraktionen 25-28 an, wobei ihr Maximum bei der Fraktion 26 liegt. Bild C zeigt die Proteinkonzentrationskurve nach dem Elektrophoreselauf von homogenisierten R.O.-vesikulierten ghosts. Man beobachtet im Gegensatz zur I.O.-Vesikulierung keine Aufspaltung in zwei Banden. Die kleineren R.O.-Vesikel und die ghosts haben trotz unterschiedlicher Größe dieselbe Oberflächenladung. Nach Smoluchowski (3.5.1.1.) liegen sowohl die ghosts als auch die R.O.-Vesikel in einem Größenbereich, in dem nur die Oberflächenladung und nicht die Teilchengröße für die elektrophoretische Beweglichkeit verantwortlich ist. Somit erklärt sich auch, weshalb das eingespritzte Homogenat nach der R.O.-Vesikulierung nur eine Bande in der trägerfreien Elektrophorese ergibt (C). Sie läuft genau in die Elektrophorese-Fraktion der unbehandelten ghosts (Fraktion 15-18). Die R.O.-Vesikel und ghosts sind unter den hier angewandten elektrophoretischen Bedingungen nicht voneinander zu trennen. Das Trennungsbild D erhält man, wenn man die gewaschenen Banden 1 und 3 (Abb. 14) nach der Dichtegradientenzentrifugation in der Elektrophoreseapparatur laufen läßt. Hierbei zeigt sich, daß sich jede der beiden einheitlichen Banden des Dichtegradienten in der Elektrophorese in zwei Banden aufspaltet, d.h. in beiden Gradientenbanden sind sowohl R.O.- als auch I.O.-Populationen nebeneinander vorhanden. Dieser Befund steht im Widerspruch zur Behauptung von Steck (39), wonach die obere Bande des Gradienten aus reinen I.O.- und die untere Bande ausschließlich aus R.O.-Partikeln bestehen soll.

4.1.7. I.O.-vesikulierte ghosts nach vorheriger Neuraminidase-Behandlung

Unbehandelte und Neuraminidase-behandelte ghosts (3.10.2.) wurden mit Promethazin-HCl bei 36°C inkubiert (3.3.2.). Hierbei zeigen beide Ghostpopulationen das gleiche Vesikuliervermögen.

Nach 90 min. werden beide Inkubationslösungen mit der Nadel homogenisiert und in die trägerfreie Elektrophorese eingespritzt (Abb. 4). Das Homogenat der unbehandelten ghosts zeigt eine Auftrennung in zwei Banden mit den Maxima bei Fr. 20 und Fr. 27/28 (Kontrolllauf). Analog dem vorherigen Kontrolllauf beobachtet man bei den homogenisierten Neuraminidase-behandelten ghosts ebenfalls zwei Banden in der Elektrophorese. Sie sind jedoch zur Kathode hin verschoben. Ihre Maxima liegen bei den Fraktionen 26 und 36. Das Proteinkonzentrationsmaximum der Bande von unvesikulierten Neuraminidase-behandelten ghosts liegt ebenfalls bei der Fraktion 36. Die R.O.-Partikel der Neuraminidase-behandelten ghosts sind somit dieser Bande zuzuordnen. Von der geschützten Innenseite der geschlossenen Ghostmembran sind jedoch keine Neuraminsäureabspaltungen erfolgt. Die gebildeten I.O.-Vesikel haben daher die gleiche Ladung wie die Vesikel von unbehandelten ghosts. Sie laufen folglich in die gleichen Fraktionen wie diese (Maximum bei Fr. 26).

Aus diesem Versuch geht eindeutig hervor, daß die Außenseite der I.O.-Vesikel mit der Innenseite der Ghostmembran identisch ist.

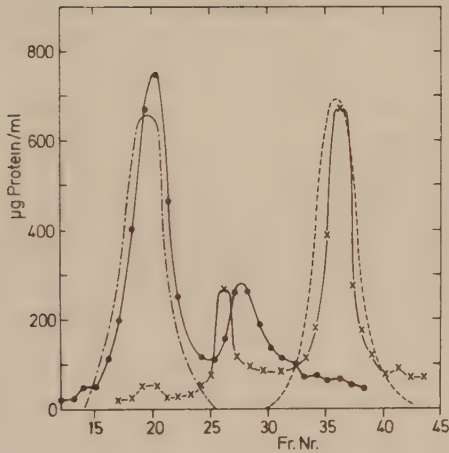


Abb. 16 Proteinkonzentrationsdiagramme von unbehandelten und Neuraminidase-behandelten ghosts nach der I.O.-Vesikulierung und anschließendem Elektrophoreselauf.

(o—o) I.O.-Vesikulierung von unbehandelten ghosts (Kontrolllauf).

(x-x-x) I.O.-Vesikulierung von Neuraminidase-behandelten ghosts.

Die gestrichelte Kurve (|---|) zeigt zur Kontrolle die Bande von unvesikulierten Neuraminidase-behandelten ghosts, die strichpunktierte Kurve (|·-·-·|) die Bande von unbehandelten ghosts.

4.1.8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die folgenden drei Elektronenmikroskop-Aufnahmen wurden nach dem "positive staining"-Verfahren gemacht (3.6.2.). Die ersten zwei Bilder zeigen die beiden möglichen Arten von Ghost-Vesikulierungen; die I.O.-Vesikulierung (Abb. 17) und die R.O. Vesikulierung (Abb. 18).

Bei der I.O. Vesikulierung beobachtet man nach der Inkubationsdauer von 10 min. leichte Einbuchtungen der Membran im Phasenkontrastmikroskop (3.6.1.), die sich im weiteren Verlauf immer weiter einstülpen. Schließlich "verklebt" die Membran an der Einschnürstelle und die I.O.-Vesikel lösen sich von der Ghostmembran ab und wandern ins Zellinnere. Nach insgesamt 90 min. ist die I.O.-Vesikulierung mit Primaquine beendet.

Die Behandlung der ghosts mit ITP/HK und Glucose bei 36°C bewirkt eine Vesikulierung nach außen (3.3.1.). Nach einer 30-minütigen Inkubation beobachtet man zahlreiche Vesikel, die sich nach außen abgeschnürt haben (Abb. 18). Ein Teil der Vesikel hat sich dabei bereits-möglicherweise durch die Präparation für das Elektronenmikroskop-von der Membranoberfläche losgelöst. Es zeigen sich im Gegensatz zu den I.O.-vesikulierten ghosts weder Einschnürungen noch Vesikel im Inneren der Zelle.

Werden die in Abb. 17 dargestellten I.O.-vesikulierten ghosts homogenisiert und anschließend auf die Elektrophoreseapparatur gegeben, so erhält man neben der R.O.- oder Ghostbande eine zweite Bande mit umgedrehten I.O.-Vesikeln (4.1.6.). Abb. 19 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme dieser abgetrennten I.O.-Vesikel. Sie besitzen, von geringfügigen Schwankungen abgesehen, die gleiche Größe.

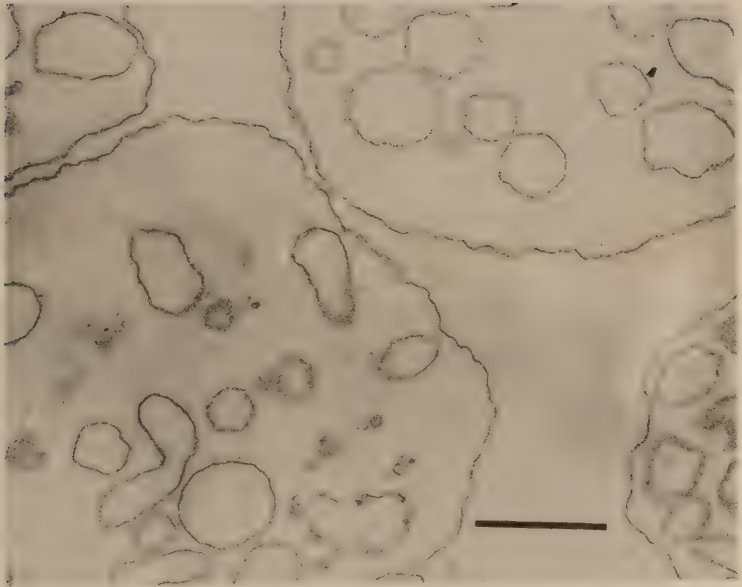


Abb. 17 Elektronenoptische Aufnahme von Primaquine-behandelten ghosts. Durch die Einstülpung der Membran haben sich Vesikel gebildet, die in der Ghostzelle eingeschlossen sind. Vergrößerung: 25 000-fach, Strich = 1 μ m.

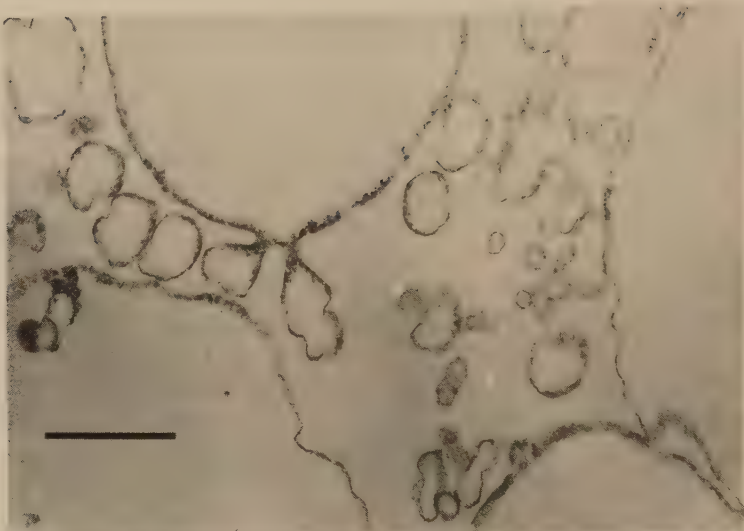


Abb. 18 Elektronenmikroskopische Aufnahme von ITP/Hexokinase/
Glucose-behandelten Erythrozyten-Ghosts. Vergrößerung:
25 000-fach, Strich = 1 μm .

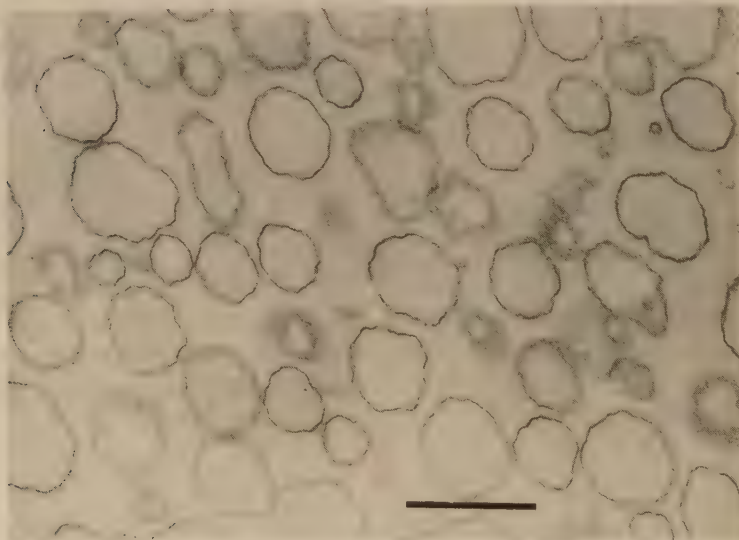


Abb. 19 Elektronenoptische Aufnahme von I.O.-Vesikeln aus
Primaquine-behandelten Erythrozyten-Ghosts. Vergrößerung
25 000-fach, Strich = 1 μm .

4.2. Charakterisierung der Membranen

4.2.1. Oberflächen- und Volumenberechnung der ghosts und I.O.-Vesikel

Die Oberfläche der ghosts und I.O.-Vesikel errechnet sich aus den gemessenen Partikeldurchmessern bzw. Radien (3.6.1.). Der gefundene Ghostdurchmesser ($\phi_G = 6,4 \mu$) stimmt dabei ziemlich genau mit dem Literaturwert von Seeman (14) überein, welcher einen Wert von $\phi_G = 6,32 \mu$ angibt.

Da die phasenmikroskopische Betrachtung der ghosts und I.O.-Vesikel eine nahezu kugelförmige Gestalt zeigt, erfolgt die Bestimmung der Partikeloberflächen nach der Kugeloberflächen-gleichung: $O_K = 4 \pi r^2$.

Setzt man den ermittelten Ghostradius ($r_G = 3,2 \mu$) in obige Gleichung ein, so erhält man einen Ghostoberflächenwert von:

$$O_G = 4 \cdot 3,14 \cdot 3,2^2 = 128,61 \mu^2$$

Für die I.O.-Vesikel errechnet sich die Oberfläche in analoger Weise zu:

$$O_{I.O.} = 4 \cdot 3,14 \cdot 0,4^2 = 2,01 \mu^2$$

Mit Hilfe der gemessenen Radien $r_G = 3,2 \mu$ und $r_{I.O.} = 0,4 \mu$ erhält man für die ghosts und I.O.-Vesikel folgende Volumenwerte ($V_K = \frac{4}{3} r^3 \pi$):

$$V_G = \frac{4}{3} \cdot 3,2^3 \cdot 3,14 = 137,19 \mu^3 \quad \text{und}$$

$$V_{I.O.} = \frac{4}{3} \cdot 0,4^3 \cdot 3,14 = 33,99 \mu^3.$$

Westerman et al. (40) und Houchin et al. (41) geben für ghosts Oberflächenwerte von $134,8 \mu^2$ bzw. $125,0 \mu^2$ an. Die entsprechenden Ghost-Volumenwerte liegen hierbei im Bereich von $140-150 \mu^3$ (bezogen auf Oberflächenwerte von $130-136 \mu^2$).

4.2.2. Membrancharakterisierung von ghosts und I.O.-Vesikeln
durch die SDS-Gelelektrophorese

Durch die SDS-Gelelektrophorese soll gezeigt werden, daß die beim I.O.-Vesikulierungsprozeß gebildeten I.O.-Vesikel dasselbe Proteinhinmuster wie die ursprünglichen Ghostmembranen aufweisen (42), d.h. daß beide Partikelpopulationen sich ausschließlich durch ihre Oberflächen unterscheiden und nicht auf Grund von Membranveränderungen entstanden sind. Die in Abb. 20 dargestellten SDS-Gelelektrophoreseläufe von ghosts (A) und I.O.-Vesikeln (B) zeigen beim Vergleich, daß sowohl bei den ghosts, als auch bei den I.O.-Vesikeln keine Veränderungen im Proteinhinmuster bestehen. Es handelt sich somit in beiden Fällen um denselben Membrantyp.

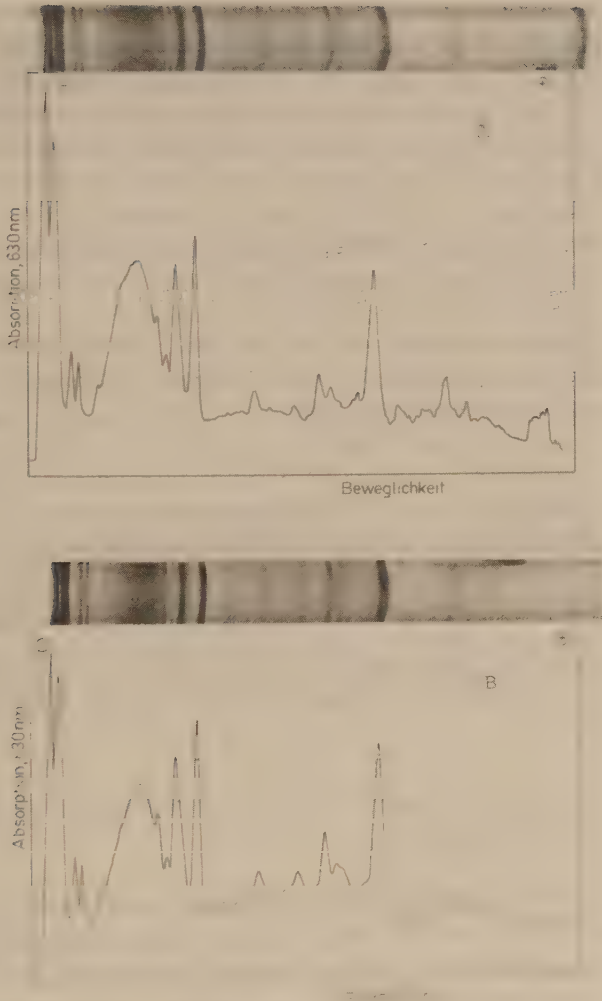


Abb. 20

Proteinmuster der Ghost- (A) und I.O.-Vesikel-Membran (B). Die beiden Proteindiagramme wurden mit dem Gilford 6040-Densitometer erstellt (Wellenlänge: $\lambda = 630 \text{ nm}$; Absorption: 1; Abtastgeschwindigkeit des Gels: 2 cm/min.). Die Proteine mit den niedrigeren Molekulargewichten sind durch das angelegte elektrische Feld am weitesten durch

(Fortsetzung Abb. 20):

das Gel gewandert (rechte Hälfte). Die beiden Proteinbanden (links) mit den größten Molekulargewichten von 255 000 und 220 000 bilden ein Dimeres, das als Spektrin bezeichnet wird. Es sitzt auf der Oberfläche der Membranninnenseite (43-45).

4.2.3. Messung der elektrophoretischen Beweglichkeiten der Partikel im Zytopherometer

Durch die Ladungsunterschiede auf den Membranoberflächen ergeben sich für die verschiedenen Partikelfractionen folgende elektrophoretische Beweglichkeiten (EB):

a)	R.O.-Vesikel:	$2,73 \pm 0,12 \text{ } \mu\text{m/sec/V/cm}$
b)	I.O.-Vesikel:	$2,06 \pm 0,12 \text{ } \mu\text{m/sec/V/cm}$
c)	ghosts:	$2,77 \pm 0,26 \text{ } \mu\text{m/sec/V/cm}$
d)	Neuraminidase-behandelte ghosts:	$1,16 \pm 0,31 \text{ } \mu\text{m/sec/V/cm}$

Die Ermittlung der Werte erfolgte dabei jeweils durch die Mittelwertsberechnung von 100 Einzelmessungen im Zeiss-Zytopherometer (3.5.2.).

4.2.4. Neuraminsäuregehalt auf der Innen- und Außenseite der Ghostmembran

Die Ermittlung des Gehalts an N-Acetyl-neuraminsäure auf der Partikeloberfläche und die anschließende Bestimmung des Restgehalts an Neuraminsäure auf der Membranninnenseite nach der Säurehydrolyse gibt eine eindeutige Aussage über das vorliegende Membranmaterial.

Die nach der I.O.-Vesikulierung, Homogenisation, Dichtegradientenzentrifugation und elektrophoretischen Trennung erhaltenen Partikel werden nach enzymatischer Abspaltung (3.10.1./3.10.2.) durch den Warren-Test (3.10.3.2.) auf ihren Neuraminsäuregehalt getestet. Hierbei zeigt sich, daß die R.O.-Partikel der linken Elektrophoresebande (Fr. 15-18) einen 6 - 7 Mal höheren Neuramin-

säuregehalt auf der Außenseite besitzen als auf der Membraninnenseite (Tab. 1). Das gleiche Ergebnis erhält man auch bei intakten ghosts nach dem Elektrophoreselauf. Die Neuraminsäurebestimmung der rechten Elektrophoresebande (Fr. 25-28) zeigt genau das gleiche prozentuale Neuraminsäureverhältnis, jedoch in umgekehrter Weise auf der Membranaußen- und -innenseite verteilt (8), d.h. bei der I.O.-Vesikelmembran befindet sich der Hauptanteil der Neuraminsäure auf der Innenseite. Der Gesamtgehalt an N-Acetylneuraminsäure pro mg Protein ist sowohl bei den linken als auch bei den rechten Elektrophoresefraktionen stets derselbe.

Diese Ergebnisse zeigen, daß es sich in beiden Fällen um ein und denselben Membrantyp handelt, der einmal mit der Außenseite nach außen und einmal mit der Außenseite nach innen vorliegt.

Bei allen Neuraminsäurebestimmungen der Außen- bzw. Innenseite der Membran wurde zur Kontrolle die gleiche Menge Zellmaterial total hydrolisiert (3.10.3.1.) und der Gesamtgehalt an Neuraminsäure ermittelt. Alle gemessenen Neuraminsäurewerte der Membraninnen- und Außenseite wurden dabei auf den Gesamtneuraminsäurewert nach der Totalhydrolyse (100 %) bezogen.

Inkubation	Dichtegradient (Dextran T 110)	trägerfreie Elektro- phorese Banden- zahl	durch Trypsin freigesetzter Neuraminsäure- gehalt (%)	durch Neuramini- dase freigesetzter Neuraminsäurege- halt (%)
I.O.-Vesiku- lierung (Primaquine)	obere Bande	2	84,4	83,6
	untere Bande	2 ⁺)	rechts links	16,1 75,7
R.O.-Vesiku- lierung (ITP/ HK/Glucose)	obere Bande	1	76,2	-
	untere Bande	1	links links	- 80,9
released ghosts	obere Bande	1	85,9	85,2
	untere Bande	1	links links	73,5 75,7
I.O.-Vesiku- lierung (Primaquine)	-	2	links rechts	- -
			77,2 11,1	-
unsealed ghosts	-	1	links	79,6
			87,2	

+) die rechte Bande enthielt zu wenig Material, um den Neuraminsäuregehalt bestimmen zu können.

Tabelle 1 Neuraminsäuregehalt verschiedener Fraktionen aus dem Dichtegradienten und der trägerfreien Elektrophorese.

4.2.5. Bestimmung des Oberflächenladungsanteils von N-Acetylneuraminsäure auf der Ghostoberfläche

Nach der Formel

$$v = \frac{\text{Wandergeschwindigkeit } \left\{ \frac{s}{t} \right\}}{\text{elektrische Feldstärke } \left\{ \frac{U}{B} \right\}}$$

und den in 3.11. ermittelten Werten errechnet sich die Beweglichkeit v im elektrischen Feld für ghosts zu:

$$v_1 = \frac{6,40 \cdot 12,8}{222,34 \cdot 1200} = 3,0704 \cdot 10^{-4} \left\{ \frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{sec}} \right\} \quad \text{oder}$$

$$v_1 \cdot 300 = 9,2112 \cdot 10^{-2} \left\{ \frac{\text{cm}}{\sqrt{\text{dyn}} \cdot \text{sec}} \right\}$$

und für Neuraminidase-behandelte ghosts zu:

$$v_2 = \frac{3,55 \cdot 12,8}{222,34 \cdot 1200} = 1,7031 \cdot 10^{-4} \left\{ \frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{sec}} \right\} \quad \text{oder}$$

$$v_2 \cdot 300 = 5,1093 \cdot 10^{-2} \left\{ \frac{\text{cm}}{\sqrt{\text{dyn}} \cdot \text{sec}} \right\}$$

s = Ablenkung zur Anode (cm)

t = Verweilzeit des Partikels im elektrischen Feld (sec)

U = Spannung zwischen den Elektroden (V)

B = Kammerbreite (cm)

Nach der Smoluchowski-Gleichung

$$v = \frac{\epsilon \cdot \xi \cdot H}{4 \pi \eta}$$

(siehe 3.5.1.2.) ergibt sich für ghosts ein Zetapotential ξ von:

$$\xi_1 = \frac{3,0704 \cdot 10^{-4} \cdot 4 \pi \eta}{\epsilon \cdot H}$$

und bei Neuraminidase-behandelten ghosts ein Wert von:

$$\xi_2 = \frac{1,7031 \cdot 10^{-4} \cdot 4 \pi \eta}{\epsilon \cdot H}$$

Da η , ϵ und H in beiden Gleichungen dieselben Werte sind, kürzen sie sich bei der weiteren Berechnung heraus.

Legt man das ξ_1 -Potential der ghosts mit 100 % fest, so ergibt sich für ξ_2 ein Wert von:

$$\xi_2 = \frac{1,7031 \cdot 100}{3,0704} = 55,47 \%$$

Es zeigt sich somit, daß durch die Behandlung der ghosts mit Neuraminidase der ξ -Potentialwert auf 55,47 % herabgesunken ist. Setzt man die abgespaltene Neuraminsäuremenge der Potentialabnahme gleich, so erhält man für die an der Außenseite der Ghostmembran gebundenen Neuraminsäure einen Ladungsanteil von 100 % minus 55,47 % = 44,53 %.

4.2.6. Leitenzyme auf der Innen- und Außenseite der Ghostmembran

Zur Identifizierung der I.O.- und R.O.-Partikel (ghosts) eignen sich insbesondere die spezifisch gebundenen Enzyme auf der Innen- bzw. Außenseite der Membran (46,47). Neben einem hohen Gehalt an N-Acetyl-neuraminsäure findet man außerdem noch das Enzym Acetylcholinesterase (48) auf der Außenseite der Ghostmembran vor. Die beiden Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (47) und NADH/H⁺-Cytochrom"c"-Oxidoreduktase (29) sind dagegen an die Membraninnenseite gebunden.

Durch die Umstülpung der Membran (I.O.-Vesikulierung) findet man die beiden zuletzt genannten Enzyme auf der Außenseite der I.O.-Vesikelmembran wieder. Die ursprünglich auf der Außenseite der Ghostmembran gebundene Acetylcholinesterase wird bei den I.O.-Vesikeln hingegen durch die sie nun umgebende Membran abgeschirmt, was eine niedrigere Acetylcholinesterase-Aktivität der I.O.-Vesikel zur Folge hat. Somit weisen die I.O.-Vesikel im Vergleich zu den ghosts eine umgekehrte Enzymverteilung auf ihrer Membranaußen- bzw. -innenseite auf (vgl. Tab. 2).

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivitäten der auf der Membraninnenseite liegenden Enzyme muß die resealed Membran aufge-

geschlossen werden. Dies erfolgt durch den Zusatz von 0,2 ml einer 0,2 %igen Triton X 100-Lösung.

Im übrigen wiesen alle Partikel nach der Behandlung mit Triton (I.O.- und R.O.-Vesikel) die gleiche spezifische Enzymaktivität auf.

Enzym	unsealed R.O.-Vesikel %	unsealed I.O.-Vesikel %	unsealed ghosts %	resealed ghosts %	resealed R.O.-Vesikel %	resealed I.O.-Vesikel %
Acetylcholin- esterase	66,4	33,6	42,8	75,1	73,3	26,7
NADH/H ⁺ -Cyto- chrom" c"-oxido- reduktase	27,0	73,0	48,3	16,4	17,8	82,2
Glycerinaldehyd- 3-Phosphat-De- hydrogenase	25,7	74,3	46,5	11,9	12,5	87,5

Die Summe der spezifischen Enzymaktivitätswerte der Membraninnen- und -außenseite wurde jeweils mit 100 % angenommen.

Tabelle 2 zeigt zusammenfassend die ungleiche Verteilung der verschiedenen Leitenzyme auf der Membraninnen- bzw. Außenseite von resealed und unsealed ghosts, R.O.-Vesikeln und I.O.-Vesikeln.

4.2.7. I.O.-Vesikulierung unter Anwendung von SITS

Um zu zeigen, daß die I.O.-Vesikel während des Vesikulierungsprozesses und nicht erst bei der Homogenisation entstehen, wurde mit Hilfe von SITS folgender Markierungsversuch gemacht. Die mit Promethazin vesikulierten ghosts (3.3.2.) werden zunächst auf dem Dextran T 110-Dichtegradienten zentrifugiert (3.7.). Die obere Bande mit den geschlossenen, vesikulierten ghosts wird zweimal gewaschen. Zur Abtrennung von möglicherweise freigesetzten I.O.-Vesikeln werden diese auf die trägerfreie Elektrophorese gegeben. Hierbei zeigt sich nur eine Bande. Die gereinigten, geschlossenen und vesikulierten ghosts werden sodann unter weitgehender Abschirmung von Licht mit SITS versetzt. Das SITS-Molekül wird dabei kovalent auf der Ghostmembran gebunden (3.12.). Zur Entfernung des überschüssigen SITS folgen nun 6 Waschschrirte. Auf die Homogenisation mit der Nadel (3.4.) folgt ein weiterer Lauf in der Elektrophorese. Man beobachtet im Gegensatz zum ersten Lauf zwei Banden, die ungefähr 10 Fraktionen auseinander liegen. Da die I.O.-Vesikulierung der Ghostmembran vor der SITS-Zugabe erfolgte, müssen die I.O.-Vesikel der rechten Bande frei von SITS sein. Die linke R.O.-Bande müßte hingegen alles SITS auf der Membranoberfläche gebunden enthalten. Die anschließende Fluoreszenzmessung bestätigt, unter Berücksichtigung des Blindwerts mit unvesikulierten ghosts, daß die ganze SITS-Menge in der linken R.O.-Bande vereinigt ist und die rechte I.O.-Bande frei von SITS ist.

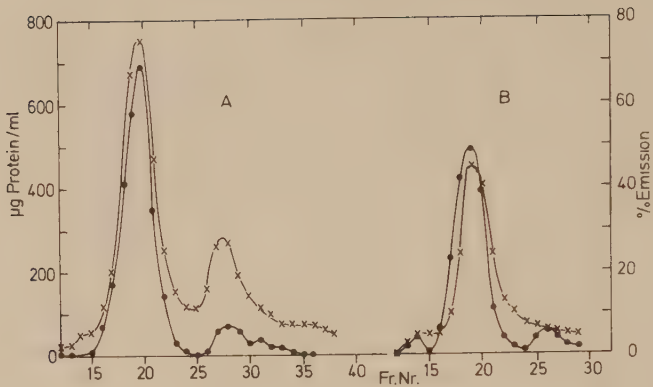


Abb. 21 A Geschlossene I.O.-vesikulierte ghosts nach der Markierung mit SITS und anschließendem Elektrophoreselauf.

Abb. 21 B SITS-behandelte, geschlossene ghosts nach dem elektrophoretischen Lauf.

(x—x) Proteinkonzentration der Fraktionen
(o—o) Fluoreszenzwert der jeweiligen Fraktionen

4.2.8. Inkubation der ghosts und I.O.-Vesikel mit Virus influenza

Die zu gleichen Teilen mit Virus influenza inkubierten resealed ghosts und I.O.-Vesikel (3.13.) werden zur Betrachtung im Elektronenmikroskop nach der "negative staining"-Methode vorbehandelt. Hierbei zeigen sich an zahlreichen Stellen auf der Ghostmembran Viruskolonien. Die Anhäufungen von Viren auf der Ghostmembran lassen auf spezifische Haftstellen für das Virus auf der Oberfläche der Erythrozytenmembran schließen. Bei den I.O.-Vesikeln hingegen sind keine anhaftenden Viren auf der Oberfläche zu beobachten. Das Fehlen der Virus influenza-spezi-

fischen Rezeptorstellen auf der I.O.-Vesikelmembran erklärt sich möglicherweise dadurch, daß in vivo die Innenseite der Erythrozytenmembran nie mit dem Virus in Berührung kommt und sich deshalb auch indifferent gegenüber diesem verhält.

5. Diskussion
 =====

5.1. Zur Charakterisierung der Partikel

1. Identität zwischen der Ghost-, R.O.- und I.O.-Membran

Erythrozytenmembranen können durch unterschiedliche Reagenzien auf zweierlei Arten vesikuliert und dabei entweder nach außen (R.O.-Vesikulierung) oder nach innen (I.O.-Vesikulierung) gestülpt werden. Von den beiden möglichen Arten der Vesikulierung kommt der I.O.-Vesikulierung zur Aufklärung von Struktur und Funktion der Zellmembran die größere Bedeutung zu. Während die R.O.-Vesikulierung Vesikel liefert, die trotz unterschiedlicher Größe in der Oberflächenbeschaffenheit (Ladung, Enzyme, z.B. Acetylcholinesterase) intakten Erythrozyten oder ghosts gleichen, zeigen die umgedrehten I.O.-Vesikel unterschiedliche Oberflächeneigenschaften. So haben sie infolge der Membranumkehrung ein anderes Enzymsystem auf der Membranaußenseite (GAPDH, NADH/H^+ -Cytochrom "c"-Oxidoreduktase) und besitzen daneben eine geringere negative Oberflächenladung. Dieser Ladungsunterschied muß im wesentlichen aus der ungleichen Verteilung der N-Acetyl-neuraminsäure auf der Membraninnen- und -außenseite resultieren. Zur Reindarstellung, Charakterisierung und weiteren Untersuchung der I.O.-Vesikel ist jedoch zunächst die Abtrennung von den nach der Homogenisation verbleibenden Zellpartikeln, d.h. R.O.-Partikeln und unvesikulierten ghosts, notwendig. Eine geeignete und zugleich schonende Methode, um verschiedene Partikeltypen mit unterschiedlichen Oberflächenladungen zu trennen, ist die trägerfreie Elektrophorese nach Hannig (15). Sie bietet sich als ideale Trennmethode für das in dieser Arbeit vorliegende Problem an, da durch die Verwendung des Zeiss-Zytopherometers für die beiden Vesikelpopulationen unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeiten (EB) berechnet worden waren (4.2.3.). So beobachtet man unter den angewandten Trennbedingungen am Ende der trägerfreien Elektrophoresekammer deutlich zwei klar voneinander abgetrennte Banden, deren Maxima ca. 10 Fraktionen auseinanderliegen (Abb. 15B). Die R.O.-Partikel sind hierbei in ihrer Oberflächenladung mit intakten ghosts identisch, d.h. sie laufen

in dieselben Fraktionen wie diese. Die umgedrehten, schwächer geladenen I.O.-Vesikel hingegen werden weniger stark zur Anode hin abgelenkt und bilden ein deutlich abgetrenntes zweites Proteinmaximum.

Zum Nachweis, daß während des Trennprozesses keine Abspaltungen (Proteingruppen, Enzyme) von der Oberfläche der I.O.-Vesikel- wie auch von der R.O.-Partikelmembran erfolgt sind, wurden mit dem getrennten Material eine Reihe von vergleichenden Versuchen durchgeführt. Aus dem nachweislich völlig intakten Enzymsystem auf der Außen- und Innenseite der umgedrehten wie auch nicht umgedrehten Partikel geht hervor, daß sie während der Aufarbeitung keine Schädigung erfahren haben. Für Aloni und Livne (48) ist speziell das Vorhandensein einer aktiven Acetylcholinesterase der beste Beweis dafür, daß die Erythrozytenmembran noch intakt ist. Auch SDS-Gelelektrophoreseläufe von elektrophoretisch isolierten I.O.- bzw. R.O.-Vesikeln oder ghosts zeigen beim gegenseitigen Vergleich der Banden, daß bei keiner der Fraktionen eine Veränderung im Proteinhinmuster festgestellt werden kann.

A. Constantopoulos (49) gibt auf Grund seiner Versuchsergebnisse einen Gesamtgehalt von $40 \cdot 10^6$ Neuraminsäuremoleküle pro Erythrozyt an. Die N-Acetyl-neuraminsäure ist an der Ghostmembran entweder 2-3' (≈ 36 % des Gesamtneuraminsäuregehalts auf der Membranoberfläche) oder 2-6' (≈ 64 % des gesamten Neuraminsäuregehalts) glykosidisch gebunden (49,50) und trägt durch die geladene Carboxylgruppe hauptsächlich zur Oberflächenladung der Membran bei. Die Totalhydrolyse mit Säure ergibt, daß beide Fraktionen (I.O.- und R.O.-Partikel oder ghosts) nach der elektrophoretischen Trennung denselben Gesamtneuraminsäuregehalt bezogen auf die Proteinkonzentration besitzen.

Man muß aus all diesen Ergebnissen schließen, daß es sich bei beiden Vesikelfraktionen um ein und denselben Membrantyp handelt.

2. Echte inside-out-Partikel

Die Abspaltung der N-Acetyl-neuraminsäure von der Membranoberfläche der I.O.- und R.O.-Partikel (ghosts) durch Trypsin oder

spezifischer durch Neuraminidase (4.2.4.) liefert dagegen unterschiedliche Neuraminsäurewerte. So weisen die durch Einstülpung nach innen gebildeten und abgetrennten I.O.-Vesikel einen wesentlich geringeren Neuraminsäureanteil auf der Oberfläche auf als die ursprünglichen ghosts oder R.O.-Partikel. Da, wie anfänglich erwähnt, die I.O.-Vesikel nach der Säurehydrolyse denselben Gesamtneuraminsäuregehalt wie intakte ghosts besitzen, kann man daraus schließen, daß bei diesen Vesikeln in Umkehrung zu den ghosts der 6-7 Mal höhere Anteil an Neuraminsäure auf der Innenseite der Membran sitzt. Dieses Ergebnis bestätigt klar, daß es sich hierbei um echte inside-out-Partikel handelt. Dies wird weiterhin durch die analog gegenläufige Enzymverteilung auf den Oberflächen der R.O.- und I.O.-Partikel gezeigt (4.2.6.), ferner durch die Markierung mit SITS (4.2.7.).

Elektronenoptische Aufnahmen der einzelnen Partikelfractionen zeigen, daß im Gegensatz zur scharf abgegrenzten äußeren Oberfläche der Ghostmembran der Innenrand diffus ins Zellinnere verläuft. Bei den I.O.-Vesikeln dagegen findet man dies in umgekehrter Weise. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um das locker an der Innenseite der Erythrozytenmembran sitzende Dimere Spektrin. Dies muß als Marker für die beiden Membranseiten betrachtet werden. Elektronenoptisch noch deutlicher ist der Beweis einer echten inside-out-Natur durch die Verwendung von Influenza-Viren zu erbringen. Das Virus heftet sich nur auf die ursprüngliche Außenseite der Erythrozytenmembran an, nicht aber auf seiner Innenseite (4.2.8.).

3. Offene und geschlossene Vesikel

Gibt man dem Puffermedium (TRA-HAC-Puffer, pH 7,4) eine geringe Menge an stabilisierenden Mg^{++} -Ionen zu, so bleiben die I.O.-Vesikel für den Zeitraum von wenigstens 24 Stunden bei $0^{\circ}C$ stabil. Ein nachfolgender Elektrophoreselauf der bereits abgetrennten I.O.-Vesikel zeigt nach diesem Zeitraum keine erneute Aufspaltung in zwei Banden. Daraus folgt, daß die I.O.-Vesikel ihre "umgedrehte" Natur beibehalten und sich nicht mehr in die ursprüngliche R.O.-Form zurückgedreht haben. Dies widerlegt die

Aussage von Steck (8), wonach die I.O.-Vesikel labil sein sollen und sich wieder leicht in R.O.-Vesikel zurückverwandeln.

Im weiteren Widerspruch zu den hier gefundenen Ergebnissen und zur Theorie der Dichtegradientenzentrifugation steht die Behauptung desselben Autors, daß sich die I.O.-Vesikel durch einen linearen Dichtegradienten vom übrigen Zellmaterial abtrennen lassen (8,39). Die obere Bande im Dextran T 110-Gradienten, die sich nach seinen Aussagen aus homogenen I.O.-Vesikeln zusammensetzen soll, zeigt im Phasenkontrastmikroskop ein Gemisch aus kleinen und großen Partikeln, das sich in der Elektrophoresekammer in zwei Banden aufspaltet (Abb. 15D). In der zur Anode hin stärker abgelenkten Bande findet man die ursprünglichen R.O.-Partikel und in der weniger stark abgelenkten Bande die schwächer geladenen I.O.-Vesikel. Es ist somit äußerst unwahrscheinlich, daß Partikel, die aus dem gleichen Zellmaterial hervorgehen und gleiche Dichten, aber unterschiedliche Oberflächenladungen besitzen, auf Dichtegradienten voneinander zu trennen sind. In diesem Fall ist die elektrophoretische Auftrennung die einzige Methode, um die I.O.-Vesikel vom übrigen Vesikelmateriale abtrennen zu können, ohne Fehlschlüssen zu erliegen.

Trägt man ghosts, die durch Hämolyse bei 0°C aus Erythrozyten hervorgehen, auf den Dextrangradienten auf, so findet man nach der anschließenden Zentrifugation bei 4°C eine einzige Bande am Boden des Zentrifugenröhrchens. Werden hingegen die ghosts einer kurzen Wärmebehandlung ($36^{\circ}\text{C}/1 \text{ Std.}$) vor der Gradientenzentrifugation unterworfen, so beobachtet man stattdessen eine Aufspaltung in zwei Banden: eine obere am Start des Gradienten und die bereits erwähnte untere Bande.

Da das verwendete Zellmaterial eine einheitliche Dichte besitzt, sollte man stets eine einheitliche Bande erwarten. Die Klärung dieses Phänomens erfolgte durch die Experimente von Bodemann und Passow (9). Nach ihrer Darstellung lockert sich das Membrangefüge bei der hypotonischen Hämolyse (0°C). Hierbei geht die ursprünglich semipermeable Eigenschaft der Erythrozytenmembran verloren. Durch die nachfolgende Inkubation bei 36°C schließt

sich jedoch der größte Teil der Ghostmembran wieder vollständig, so daß die Membran ihre Semipermeabilität zurückgewinnt. Es handelt sich somit um einen reversiblen Prozeß, der als sogenanntes "resealing" der Membran bezeichnet wird. Ebenso verhält es sich auch bei den gebildeten I.O.- und R.O.-Vesikeln. Auch hier erhält man nach der Inkubation bei 36°C zweierlei Zellpopulationen, wiedergeschlossene (resealed) und nicht wiedergeschlossene (unsealed). Somit erklärt sich, weshalb die Homogenate der R.O.- und I.O.-Vesikulierung zwei Banden im Gradienten bilden. Die obere Bande enthält die wiedergeschlossenen R.O.- bzw. I.O.-Vesikel sowie intakte ghosts, die Bande am Boden des Gradiententubes dieselben, jedoch nicht wiedergeschlossenen Partikel und zerstörtes Membranmaterial. Infolge der Membrandurchlässigkeit dringt die Gradientenlösung unter Mitwirkung der Zentrifugationskraft kontinuierlich in das Partikel ein, bis es schließlich dieselbe Dichte der Lösung im unteren Gradiententeil angenommen hat. Alle Vesikel am Gradientenboden sind daher von nicht wiedergeschlossener Natur. Die resealed, d.h. wiedergeschlossenen Vesikel sind hingegen gegenüber der sie umgebenden Gradientenlösung dicht und bleiben infolgedessen oben auf dem Gradientenkissen sitzen.

Die Dichtegradientenzentrifugation stellt somit eine einfache und schnelle Methode dar, um resealed von unsealed Partikeln abzutrennen.

Da die Auftrennung in der Elektrophorese nach der Oberflächenladung erfolgt und es hierbei unbedeutend ist, ob die Partikel geschlossen oder nicht geschlossen sind, kommt es im Fall der I.O.-Vesikulierung sowohl bei der oberen als auch unteren Bande des Dichtegradienten zur Aufspaltung in zwei Banden (Abb. 15D), wobei die eine Bande die gleiche Oberflächenladung wie die ursprünglichen ghosts besitzt. Geht man von der oberen Bande des Gradienten (Abb. 14/3) aus, so handelt es sich bei den Partikeln der linken Bande, die mit der ursprünglichen Ghostbande identisch ist, um resealed ghosts oder R.O.-Partikel. Die schwächer geladenen Partikel der zweiten, weniger stark abgelenkten Bande, tragen den Hauptanteil der Ladung auf der Innenseite und sind folglich echte resealed I.O.-Vesikel.

Durch die Kombination der Dichtegradientenzentrifugation mit der trägerfreien Elektrophorese bekommt man eine Auftrennung der Vesikel nach zwei Kriterien, nämlich nach der Unversehrtheit der Membran und nach der für die Partikel charakteristischen Oberflächenladung. Diesem Aufarbeitungsgang kommt deshalb eine große Bedeutung zu, da für alle weiteren Versuche (Enzymteste, Neuraminsäureabspaltung, Transportteste, etc.) Partikel erforderlich sind, die in der Oberflächenladung einheitlich und im Membrangefüge intakt sein müssen.

5.2. Zum Mechanismus der Vesikulierung

Als letzter und wichtiger Punkt soll schließlich noch versucht werden, den komplexen Prozeß der Vesikulierung zu durchleuchten. Neben der untergeordneten R.O.-Vesikulierung werden für die I.O.-Vesikulierung insgesamt drei verschiedene Mechanismen diskutiert. Der Mechanismus kann hierbei entweder chemischer, osmotischer oder enzymatischer Natur sein.

1. Keine Vesikulierung durch Homogenisation.

Zum Beweis, daß die I.O.-Vesikel bei der Inkubation mit Vitamin A Promethazin-HCl etc. und nicht erst bei der Homogenisation der Membran entstehen, wurde der Markierungsversuch mit SITS gemacht (4.2.7.). Mit Hilfe von Promethazin-HCl wurden bei 36°C gebildete, geschlossene und elektrophoretisch gereinigte I.O.-vesikulierte ghosts mit SITS markiert und der Überschuß an SITS durch Waschen entfernt. Man erhält somit SITS-markierte, geschlossene, I.O.-vesikulierte ghosts. Durch Homogenisation und einen weiteren Elektrophoreselauf kommt es zur Abtrennung der I.O.-Vesikel vom übrigen R.O.-Zellmaterial. Es zeigt sich, daß der gesamte SITS-Anteil in der linken R.O.-Bande wiedergefunden wird. Die rechte I.O.-Bande ist, unter Berücksichtigung des Blindwertes, frei von SITS. Daraus folgt, daß eine nachträgliche Vesikelbildung bei der Homogenisation nicht stattgefunden haben kann. Wäre dies nämlich der Fall, so müßten die aus der markierten Ghostmembran hervorgegangenen I.O.-Vesikel einen Teil der SITS-Ladung tragen und diese müßte in der I.O.-Vesikelfraktion der Elektrophorese wiedergefunden werden. Da dies im vorliegenden Experiment nicht zutrifft, ist der Verdacht einer nach-

träglichen Vesikulierung mit Sicherheit auszuschließen.

2. Keine Vesikulierung durch Oberflächen-Neuraminsäure
Neuraminidase-behandelte ghosts zeigen bei der Inkubation mit Promethazin-HCl bei 36°C das gleich gute Vesikuliervermögen wie unbehandelte ghosts (4.1.7.). Da auf der geschützten Innenseite der resealed Membran unter Zugabe von Neuraminidase keine Abspaltungen erfolgen können, müssen sowohl die unbehandelten wie auch die enzymatisch behandelten ghosts dieselbe Ladung auf der Membranınnenseite tragen, d.h. die aus beiden Zelltypen gebildeten I.O.-Vesikel müssen folglich auch dann die gleich Oberflächenladung besitzen. Dies wird durch den Elektrophoreselauf (Abb. 16) bestätigt. Die Maxima der I.O.-Vesikelfraktionen aus beiden Präparationen befinden sich in denselben Elektrophoresefraktionen. Aus diesem Experiment folgt, daß die im verstärkten Maße auf der Ghostoberfläche glykosidisch gebundene N-Acetylneuraminsäure bei der I.O.-Vesikulierung keine Bedeutung hat und zur Klärung des Mechanismus der Vesikulierung nicht herangezogen werden kann.

3. Keine Energieabhängigkeit der I.O.-Vesikulierung
Penniston (10) und andere Autoren (51-53) postulieren für die beiden möglichen Arten der Vesikulierung zweierlei Energiezustände: einen energiereichen, ATP-abhängigen Zustand, der zur Endozytose (I.O.-Vesikulierung) führt und den energiearmen Zustand der Exozytose (R.O.-Vesikulierung) unter Zuhilfenahme von ITP/Hexokinase und Glucose. Die auf der Innenseite der Ghostmembran liegenden ATP-asen (54) liefern hierbei durch die Spaltungsenergie des von außen zugeführten Adenosintriphosphates die zur I.O.-Vesikulierung benötigte Energie.

In verschiedenen Experimenten wurde nun untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der hier beschriebenen I.O.-Vesikulierung mit Primaquine bzw. Promethazin und der ATP-abhängigen Vesikulierung besteht. Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht, ghosts durch verschiedene Konzentrationen von ATP (2 mM - 8 mM) mit und ohne Zusatz von $MgSO_4$ zu vesikulieren. Um ATP bzw. $MgSO_4$ vor dem resealing der Membran zu den auf der Membranınnenseite liegenden ATP-asen zu transportieren, wurden die beiden Reagen-

zien entweder bei der Hämolyse oder vor der Wärmeinkubation zugesetzt. In keinem der genannten Fälle konnte jedoch eine I.O.-Vesikulierung beobachtet werden. Die Zugabe der Reagenzien während der Hämolyse (siehe Penniston) ist wenig sinnvoll, da die Ghostmembran in diesem "offenen" Stadium zwar alle von außen zugeführten Stoffe ohne großen Widerstand ins Zellinnere passieren läßt, sie jedoch bei den folgenden Waschschritten genauso leicht wieder aus der Zelle gewaschen werden können. Die Verwendung von ATP und MgSO_4 während der Hämolyse und die anschließend zu beobachtende I.O.-Vesikulierung mit Primaquine oder Promethazin kann somit nicht auf die vorherige ATP-Zugabe zurückgeführt werden (55). Die gleichzeitige Zugabe von ATP, MgSO_4 und Primaquine-Diphosphat oder Promethazin-HCl ergibt nach der Inkubation bei $36^\circ\text{C}/90$ min. keine brauchbare I.O.-Vesikulierung. Bei Primaquine beobachtet man vereinzelt Ansätze zu Einstülpungen und bei Promethazin nur schwach angedeutete Einbuchtungen, d.h. keine Stimulierung der Vesikulierung, sondern eine Hemmung. Warum ATP als Vesikulationshemmer wirkt, ist möglicherweise auf die erhöhte Osmolarität des Mediums zurückzuführen (siehe Seite 79).

Um ganz sicher zu gehen, daß für eine Vesikulierung mit Hilfe von Vitamin A, Primaquine oder Promethazin eine Reaktion ATP-ase in situ ATP ausgeschlossen werden kann, wurde während der Hämolyse Hexokinase und Glucose zugesetzt. Hierbei wird alles in situ ATP des Erythrozyten zur Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat verbraucht. Die so behandelten Membranen zeigen nach der Zugabe von Primaquine und Inkubation bei $36^\circ\text{C}/90$ min. eine gute Vesikelbildung, d.h. es kann sich auch in diesem Fall um keinen ATP-ATP-ase-abhängigen Prozeß handeln.

Um eine eventuell bestehende Beziehung zwischen Primaquine und den membrangebundenen ATP-asen zu klären, wurden zur Inhibition der Membran-ATP-asen (56) unsealed ghosts mit unterschiedlichen Mengen (0,2-0,4 mM) an Ouabain (= g-Strophanthin) behandelt. Derartig behandelte ghosts wurden sodann unter Zugabe von Primaquine oder Promethazin bei 36°C mit und ohne ATP/Mg^{++} -Zusatz inkubiert. Nur bei den ATP-freien Fraktionen zeigte sich dasselbe

uneingeschränkte Vesikuliervermögen wie bei unbehandelten Ghostzellen. Daraus geht hervor, daß eine I.O.-Vesikelbildung auch ohne Stimulierung der ATP-asen, d.h. ohne Energie, möglich ist. Ergänzt wird dieser Befund weiterhin dadurch, daß acht Tage alte ghosts, die nach dieser Zeit nur noch eine geringe ATP-ase Aktivität aufweisen, genauso gut wie frische vesikulieren.

Die erhaltenen Ergebnisse zwingen zu dem Schluß, daß die in dieser Arbeit beschriebenen Vesikulierungen nach einem nicht energieabhängigen Mechanismus ablaufen müssen.

4. Rolle von Vitamin A, Primaquine und Promethazin

Abweichend von der Energiehypothese findet man in einigen Publikationen (14,57) die Ansicht vertreten, daß fremde Liganden mit hoher Affinität zur Membran, so z.B. lipophile Drogen und Antigene, die Architektur der Membran beeinflussen können. Die Wechselwirkung dieser membranaffinen Stoffe ist häufig mit einer Änderung der Membranstabilität verbunden. Diese wird äußerlich dadurch sichtbar, daß es zu einer Gestaltsänderung der Zelle kommt. So betrachtet, handelt es sich auch bei jeglicher Art von Vesikulierung um eine Veränderung der Zellmorphologie. Seeman (14) zählt eine Reihe von Stoffen auf, die mit der Membran in Wechselwirkung treten und sie im niedrigen Konzentrationsbereich (10^{-6} - $5 \cdot 10^{-3}$ M) stabilisieren. Einige von ihnen sind Vitamin A, Testosterone, Nonylalkohol, Lysolecithin, Butyrylperazin, Promethazin und Prochlorperazin. Hohe Konzentrationen ($>2 \cdot 10^{-2}$ M) dieser Stoffe führen hingegen zur Zerstörung der Membran. Vergleicht man die Strukturformel des Vitamin A mit denen der weiter genannten Verbindungen, so haben sie folgendes gemeinsam: Am einen Ende sitzt eine aromatische oder monocyclisch konjugierte Gruppierung, die durch eine hydrophobe aliphatische Seitenkette mit dem gegenüberliegenden polaren, hydrophilen Ende verbunden ist. Da die drei Verbindungen Primaquine, Promethazin und Prochlorperazin im wässrigen Milieu schwer löslich oder unlöslich sind, wurden sie deshalb in der gut wasserlöslichen Salzform angewandt. Aus demselben Grund wurde auch beim Vitamin A₁ neben der schwer wasserlöslichen Form das wassermischbare Vitamin A-Trockenpulver (1 g = 300 000 i.E.) der Firma Merck verwendet. Wahrscheinlich besitzt jede der zuvor angeführten Substanzen eine für sie stoffspezifische Stabilisierungs-Wirkungskurve. Die

in der vorliegenden Arbeit ermittelten Stabilisierungskurven für Primaquine wie auch Promethazin (4.12.) liegen dabei genau in dem Stabilisierungsbereich einiger Kurven von Seeman (14). Als Mechanismus der Membranstabilisierung könnte man sich vorstellen, daß das positiv geladene, polare Ende des Moleküls (bei Promethazin: tert. Aminogruppe, bei Prochlorperazin: Methylpiperazinring) mit den negativen Ladungen der hydrophilen Partien auf der Membran (Phospholipide) eine Ionenbindung eingeht, während der hydrophobe Teil des Moleküls (Phenothiazin-Ring) an die hydrophoben Regionen der Membran gebunden ist. Bei den Alkoholen (z.B. Vitamin A) ragt die endständige Hydroxylgruppe aus der Membran heraus, während die lipophile Alkylseitenkette in den hydrophoben Teil der Membran eingebettet ist (14,58). Die Wechselwirkung all der erwähnten Reagenzien mit der Membran zeigt sich entweder durch die Zunahme der Zelloberfläche und damit des Volumens oder durch eine Änderung der Membran-Viskoelastizität (14). Das Zusammenwirken beider Vorgänge ist möglicherweise die Ursache für die I.O.-Vesikulierung der Ghostzelle. Seeman (14) spricht in diesem Fall von einer "überexpandierten" Zelle, die zunächst viele Omega-ähnliche Figuren am äußeren Zellrand zeigt, aus denen sich im weiteren Verlauf I.O.-Vesikel bilden können.

Damit ist aber noch nicht erklärt, aus welchen Gründen und nach welchem Mechanismus die Zellmembran zwischen einer R.O.- oder I.O.-Vesikulierung gesteuert werden kann.

5. Osmotische Einflüsse

Möglicherweise wird durch die geeignete Wahl des Osmosewerts der Pufferlösung der zuvor genannte chemische Vesikulierungsmechanismus noch unterstützt. Dies kann bei der Verwendung geeigneter Puffer mit einem guten Stabilisierungsvermögen, wie z.B. Tri-äthanolamin, Tris, TES, HEPES (sehr schwache Komplexbildner) soweit gehen, daß in einem limitierten Osmolaritätsbereich (20 mOsm) auf die Zugabe der stabilisierenden Drogen verzichtet werden kann (4.1.2.) und trotzdem eine Vesikulierung mit einer guten Ausbeute an I.O.-Vesikeln erfolgt. Im Fall von 0,005 M Na-phosphat-Puffer, pH 8,0 (15 mOsm) jedoch erfolgt ohne Zusatz der stabilisierend wirkenden Stoffe (Vitamin A, Primaquine, Promethazin, Prochlor-

perazin etc.) keine kontrolliert ablaufende I.O.-Vesikulierung.

Bei Anwendung der oben aufgeführten Puffer mit noch niedrigeren Osmolaritäten (<10 mOsm) erhält man die meist als unspezifische "Stechapfelform" zu beobachtende Abschnürung von Vesikeln nach außen (59). Inwieweit die energiearme R.O.-Vesikulierung nach Penniston (10) mit dieser Erscheinung in Zusammenhang steht, ist nur anzunehmen, wurde aber nicht weiter verfolgt.

Wägt man alle drei genannten Mechanismen gegeneinander ab, so kommen für die in dieser Arbeit besprochenen I.O.-Vesikulierungen die beiden letzten Mechanismen, d.h. der chemische und der osmotische in Frage. Es ist damit keineswegs geklärt und auszusprechen, daß es Bereiche auf der Erythrozytenmembran gibt, die durch die Bedingungen des Mediums stimuliert werden können, um sich dann nach innen bzw. außen zu stülpen. Der jeweilige Vesikulierungsmechanismus könnte hierbei bereits durch den unterschiedlichen Aufarbeitungsgang bis zu den ghosts (EDTA-Zusatz (60), andere Puffersysteme etc.) vorprogrammiert sein.

6. Zusammenfassung
=====

Gewaschene Human-Erythrozyten der Blutgruppe O+ wurden im hypotonischen Puffer hämolytiert. Die dabei gewonnenen weißen Erythrozytenmembranen (ghosts) dienten als Ausgangsmaterial für Versuche zum Studium der Zellmembran sowie zur Klärung des Vesikulierungsmechanismus. Im einzelnen wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Membran von Erythrozytenghosts kann durch Behandlung mit ITP/Hexokinase/Glucose nach außen (Exozytose) oder durch Vitamin A, Primaquine, Promethazin etc. nach innen (Endozytose) gestülpt werden. Die anschließende Homogenisation liefert neben dem verbleibenden Zellmaterial right-side-out- bzw. inside-out-Vesikel.
2. Die Markierung der Membran mit SITS (= 4-Acetamido-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-Disulfonsäure) zeigt, daß die inside-out-Vesikulierung während der Inkubation erfolgt und nicht erst durch eine nachträgliche Reaggregation der homogenisierten Bruchstücke.
3. Durch die Inkubation bei 36°C kommt es zum teilweisen Wiederschließen (resealing) der Membran, d.h. die Membran erhält ihre semipermeable Eigenschaft wieder zurück. Die Abtrennung der geschlossenen (resealed) von den nicht wieder-geschlossenen (unsealed) Vesikeln erfolgt mittels einer 3,14 %igen Dextran T 110-Gradientenzentrifugation.
4. Die obere Bande des Gradienten, die aus geschlossenen Partikeln besteht, spaltet sich im Fall der inside-out-Vesikulierung in der trägerfreien Elektrophorese in zwei Banden auf. Eine der Fraktionen setzt sich hierbei aus rightside-out-Partikeln zusammen, die dieselbe Oberflächenladung wie intakte ghosts besitzen. Die zweite, weniger stark abgelenkte Partikelfraktion, enthält die schwächer negativ geladenen inside-out-Vesikel. Eine Abtrennung der ghosts bzw. R.O.-Vesikel von den I.O.-Vesikeln durch

Dichtegradientenzentrifugation (nach Steck) konnte dadurch widerlegt werden, daß sich jede der beiden Gradientenbanden elektrophoretisch nochmals in zwei Banden aufspaltet (R.O.- und I.O.-Bande).

Die rightside-out-Vesikel (nach der R.O.-Vesikulierung), die die gleiche Oberflächenladung wie intakte ghosts aufweisen, lassen sich von diesen elektrophoretisch nicht trennen.

5. Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der inside-out- und rightside-out-Partikel resultiert aus der ungleichen Ladungsverteilung von N-Acetyl-neuraminsäure auf der Innen- bzw. Außenseite der Ghostmembran. So findet man auf der Außenseite einen 6 - 7 Mal größeren Neuraminsäuregehalt als auf der Innenseite. Der starke Ladungsbeitrag der Neuraminsäure auf der Oberfläche der Ghostmembran geht daraus hervor, daß nach Abspaltung derselben mit Neuraminidase aus *Vibrio comma* (cholerae) die elektrophoretische Beweglichkeit stark abnimmt. Die berechnete Restladung auf der Ghostoberfläche beträgt hernach nur noch 55,47 % (bezogen auf 100 % ursprüngliche Gesamtladung).
6. Der Beweis der Identität der beiden getrennten Fraktionen (inside-out- und rightside-out-Partikel) wurde durch die analytische SDS-Gelelektrophorese erbracht.
7. Die Charakterisierung der beiden elektrophoretisch getrennten Partikelfraktionen (inside-out- und rightside-out-Partikel) erfolgte durch die Bestimmung des Neuraminsäuregehalts sowie durch den Nachweis der spezifischen Leitenzyme auf der Außen- (Acetylcholinesterase) und Innenseite (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; NADH/H^+ -Cytochrom "c"-Oxidoreduktase) der Ghostmembran. Auch elektronenoptisch können beide Partikelfraktionen mit geeigneten Markern, so z.B. Virus influenza, voneinander unterschieden werden.
8. Versuche zum Vesikulierungsmechanismus ergaben, daß die in dieser Arbeit beschriebene inside-out-Vesikulierung auf der

chemischen Wechselwirkung der verwendeten Reagenzien (Vitamin A, Primaquine, Promethazin etc.) mit der Membranoberfläche beruht. Es kommt zu einer Ionenbindung zwischen den hydrophilen Bereichen der Membran (Phospholipide) und den polaren, geladenen Gruppierungen der zugesetzten Reagenzien. Die hydrophoben Gruppen dagegen verbinden sich mit den lipophilen Bereichen der Ghostmembran. Diese Wechselwirkung zwischen der Membran und den von außen zugeführten Reagenzien bewirkt eine Vergrößerung der Zelloberfläche sowie eine Änderung der Membran-Viskoelastizität. Beide Erscheinungen führen zur inside-out-Vesikulierung. Unterstützt wird der I.O.-Vesikulierungsprozeß durch die Wahl eines Puffers mit einem Osmosewert im eng begrenzten Bereich von 17 - 20 mOsm.

9. Die Verwendung von ^{14}C -markiertem ATP ergab, daß Adenosintriphosphat durch die unsealed Membran zu den innenliegenden ATP-asen gelangen kann. Die anschließende Inkubation führte jedoch zu keinen Membraneinschnürungen. Somit ist bewiesen, daß die beschriebene Vesikulierung nicht energieabhängig ist, wie vermutet wurde.

Literaturverzeichnis

=====

1. Biologie in unserer Zeit, 3. Jahrg., No. 5 (1973)
S. 131-136.
2. Jain, M.K., "The Biomolecular Lipid Membrane": A System
(1972) pp. 6-10, Van Nostrand Reinhold / Company, New York,
Cincinnati, Toronto, London.
3. Marchesi, V.T., Jackson, R.L., Segrest, J.P., Kahane, I.,
Fed. Proceed., 32, No. 8 (1973) pp. 1833-1837.
4. Segrest, J.P., Kahane, I., Jackson, R.L., Marchesi, V.T.,
Arch. Biochem. Biophys., 155 (1973) pp. 167-183.
5. Nicolson, G.L., J. Cell Biol., 57 (1973) pp. 373-387.
6. Nicolson, G.L., Painter, R.G., J. Cell Biol., 59 (1973)
pp. 395-406.
7. Zahler, P., Schweiz. med. Wschr., 101, No. 42 (1971)
S. 1490-1492.
8. Steck, T.L., Weinstein, R.S., Straus, J.H., Wallach, D.F.H.,
Science, 168 (1970) pp. 255-257.
9. Bodemann, H., Passow, H., J. Memb. Biol., 8 (1972) pp. 1-26.
10. Penniston, J.T., Green, D.E., Arch. Biochem. Biophys., 128
(1968) pp. 339-350.
11. Glauert, A.M., Daniel, M.R., Lucy, J.A., Dingle, J.T., J.
Cell Biol., 17 (1963) pp. 111-121.
12. Dingle, J.T., Lucy, J.A., Biochem. J., 84 (1962) pp. 611-621.
13. Ginn, F.L., Hochstein, P., Trump, B.F., Science, 164 (1969)
pp. 843-845.

14. Seeman, Ph., "Membrane Stabilization and Expansion by Drugs", pp. 384-391 aus "Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten" von Deutsch, E., Gerlach, E., Moser, K., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968).
15. Hannig, K., Heidrich, H.-G. in: Methods of Enzymology XXI, Editors: Fleischer, S. and Packer, L., Academic Press, New York, San Francisco, London (1974) pp. 746.
16. Seaman, G.V.F., Heard, D.G., Blood, 18, No. 5 (1961) pp. 599-604.
17. Bangham, A.D., Heard, D.H., Flemens, R., Seaman, G.V.F., Nature, Sept. 6 (1958) pp. 642-644.
18. Mehrishi, J.N., "Molecular Aspects of the Mammalian Cell Surface" in: Progress in Biophys. and Molec. Biol., 25 (1972) pp. 12-16, edited by Butler, J.A.V. & Noble, D., Pergamon Press, Oxford and New York.
19. Mehrishi, J.N., Ärzt. Lab., 18 (1972) pp. 225-229.
20. Maurer, H.R., "Disk-Elektrophorese", Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968).
21. Laemmli, U.K., Nature (Lond.), 227 (1970) pp. 680-685.
22. Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, No. 5 (1967) pp. 816-820.
23. Weber, K., Osborn, M., J. Biol. Chem., 244 (1969) pp. 4406-4412.
24. Luft, J.H., J. Biophys. Biochem., Cytology, 9 (1961) pp. 409-414.
25. Heidrich, H.-G. & Hannig, K., Adv. in Automated Analysis (1970), pp. 347-350.
26. "biochemica information I", pp. 11, Boehringer, Mannheim.

27. "biochemica information I", pp. 105-106, Boehringer, Mannheim.
28. Bergmeyer, H.U., "Methoden der enzymatischen Analyse"
Band I, 3. Aufl. (1974) S. 495-496, Verlag Chemie, Weinheim/
Bergstraße.
29. Stahn, R., Maier, K.-P., Hannig, K., J. Cell Biol., 26
(1965) pp. 219
30. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H., Biochem. 10,
No. 13 (1971) pp. 2606-2617.
31. Warren, L., J. Biol. Chem., 234 (1959) pp. 1971-1975.
32. Aminoff, D., Biochem. J., 81 (1961) pp. 384-392.
33. Eylar, E.H., Madoff, M.A., Budy, O.V., Oncley, J.L.,
J. Biol. Chem., 237, No. 6 (1962) pp. 1992-2000.
34. Maddy, A.H., Biochim. Biophys. Acta, 88 (1964) pp. 390-399.
35. Marinetti, G.V., Gray, G.M., Biochim. Biophys. Acta, 135
(1967) pp. 580-590.
36. Heidrich, H.-G., Leutner, G., Europ. J. Biochem., 41
(1974) pp. 37-43.
37. Heidrich, H.-G., FEBS Lett., 17 (1971) pp. 253-256.
38. Hannig, K., Heidrich, H.-G., 8090-Enzymology, 31-(H),
Gal. 255-259.
39. Steck, T.L., Straus, J.H., Wallach, D.F.H., Biochim.
Biophys. Acta, 203 (1970) pp. 385-393.
40. Westerman, M.P., Pierce, L.E., Jensen, W.N., J. Lab.
Clin. Med., 57 (1961) pp. 819

41. Houchin, D.N., Munn, J.I., Parnell, B.J., Blood, 13
(1958) pp. 1185-1191.
42. Steck, T.L., "The Organization of Proteins in Human
Erythrocyte Membranes" (1972) pp. 71-93, aus: Membrane
Research, ed. by C. Fred Fox, Academic Press, New York and
London.
43. Capaldi, R.A., Scientific American, March 1974, pp. 27-33.
44. Nicolson, G.L., Marchesi, V.T., Singer, S.J., J. Cell
Biol., 51 (1971) pp. 265-272.
45. Lessin, L.S., "Membrane Ultrastructure of Normal, Sickled
and Heinz-Body Erythrocytes by Freeze-Etching", Section IV,
pp. 151-168, aus: Red Cell Shape, Editors: Bessis, M.,
Weed, R.J., Leblond, P.F., Springer Verlag, New York,
Heidelberg, Berlin (1973).
46. Steck, T.L., Kant, J.A., 8090-Enzymology, 31-(H), Gal. 49-51.
47. Kant, J.A., Steck, T.L., Nature New Biology, 240 (1972)
pp. 26-28.
48. Aloni, B., Livne, A., Biochim. Biophys. Acta, 339 (1974)
pp. 359-366.
49. Constantopoulos, A., Cytobios, 7 (1973) pp. 97-102.
50. Seaman, G.V.F., J. Supramolec. Struct., "Platelet and Red
Cell Membrane Structure" (1973) pp. 437-447, by Alan R. Liss,
Inc., 150 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10011.
51. Hayashi, H., Penniston, J.T., Arch. Biochem. Biophys., 159
(1973) pp. 563-569.
52. Hayashi, H., Plishker, G.R., Vaughan, L., Penniston, J.T.,
Kenan Laboratories of Chemistry and Dental Research Center,
University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina

- 27514, "Energy-Dependent Endocytosis in Erythrocyte Ghosts (IV)" (unveröffentlichte Ergebnisse).
53. Schrier, S.L., Seeger, M., Junga, I., Bensch, K., Blood, 42 No. 6 (1973) pp. 981.
54. Marchesi, V.T., Palade, G.E., J. Cell Biol., 35 (1967) pp. 385-404.
55. Plishker, G.A., Hayashi, H., Vaughan, P., Penniston, J.T., Fed. Proceed., 33, No. 5 (1974) pp. 1284.
56. Perrone, J.R., Blostein, R., Biochim. Biophys. Acta, 291 (1973) pp. 680-689.
57. Wallach, D.F.H., Weidekamm, E., Umsch. Wiss. Tech., 73 (1973) pp. 182-183.
58. Bangham, A.D., Dingle, J.T., Lucy, J.A., Biochem. J., 90 (1964) pp. 133-140.
59. Baker, R.F., Fed. Proceed., 26, No. 6 (Nov.-Dec. 1967) pp. 1785-1801.
60. Reynolds, J.A., Trayer, H., J. Biol. Chem., 246, No. 23 (Dec. 10/1971) pp. 7337-7342.

Lebenslauf

Am 15. Juni 1946 wurde ich, Gerhard Leutner, als Sohn des Arztes Dr. Josef Leutner und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Zech, in Rosenheim geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Kaufbeuren (1952-1956) trat ich in die Oberrealschule in Kaufbeuren ein. 1964 wechselte ich in das "Allgäu-Gymnasium" nach Kempten über. Dort legte ich 1966 die Reifeprüfung ab.

Im Herbst 1966 begann ich mit dem Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München. Nach Ablegung des Vor-examens am 6. November 1969 beendete ich dieses Studium am 30. Juni 1971 mit dem Staatsexamen. Meine Frau Brigitte, geb. Höltl, heiratete ich im gleichen Jahr.

Vom 1. Oktober 1971 bis Anfang September 1974 arbeitete ich experimentell am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München an der vorliegenden Dissertation.

